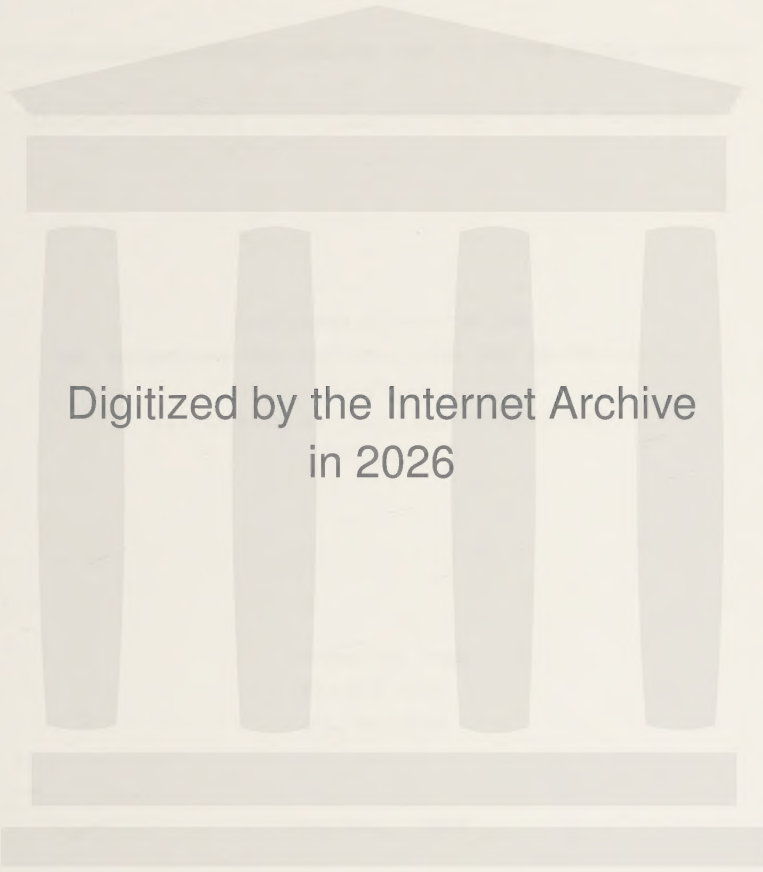


HEPATITIS-B-VIRUS
UND PRIMÄRES LEBERKARZINOM:
MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE
DER IM GENOM EINER HUMANEN
HEPATOM-ZELLINIE INTEGRIERTEN
HEPATITIS-B-VIRUS-DNA

Stefan Koch

*Less
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**HEPATITIS-B-VIRUS UND PRIMÄRES LEBERKARZINOM:
MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE DER IM GENOM EINER HUMANEN
HEPATOM-ZELLINIE INTEGRIERTEN HEPATITIS-B-VIRUS-DNA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Stefan Koch
aus München

München, 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 17.4.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. Hepatitis-Viren	7
1.1.1. Hepatitis-A-Virus	7
1.1.2. Hepatitis-B-Virus	8
1.1.3. Non-A-Non-B-Virus	9
1.2. Hepatitis-B-Virus und primäres Leberkarzinom	9
1.3. Genom des HBV	13
1.3.1. Transkription und Expression viraler Proteine	15
1.3.2. Replikation des HBV	19
1.4. Wechselwirkungen zwischen HBV und Zelle	21
1.4.1. Akute und chronische HBV-Infektionen	21
1.4.2. Mechanismen der malignen Transformation	22
1.5. Untersuchungssysteme für HBV	25
1.5.1. Infektion von Zellkulturen	25
1.5.2. Tiermodelle	25
1.5.3. Humane Hepatomzelllinie mit integrierter HBV-DNA	26
PROBLEMSTELLUNG	28
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1. Material	29
2.1.1. Chemikalien	29
2.1.2. Enzyme	30
2.1.3. Kleinmaterial	31
2.1.4. DNA	32
2.1.5. E. coli Bakterienstämme	33
2.1.6. Zelllinien	33
2.2. Methoden	34
2.2.1. Arbeiten mit DNA	34
2.2.1.1. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	34
2.2.1.2. Schnellpräparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.3. Isolierung von lambda-DNA	36

2.2.1.4. Isolierung chromosomaler DNA	37
2.2.1.5. Restriktion	37
2.2.1.6. Agarosegel-Elektrophorese	38
2.2.1.7. Elektroelution von DNA-Fragmenten	39
2.2.1.8. Southern Analyse	39
2.2.1.9. Nicktranslation	41
2.2.1.10. DNA-Sequenzierung	42
2.2.1.10.1. Dephosphorelierung	43
2.2.1.10.2. Endmarkierung	43
2.2.1.10.3. Basenspezifische Reaktionen	43
2.2.1.10.4. Strangbruch	46
2.2.1.10.5. Sequenzierungsgele	46
2.2.1.11. Computerprogramme	49
2.2.2. Arbeiten mit Bakterien und Phagen	50
2.2.2.1. Medien	50
2.2.2.2. Übernachtskultur	50
2.2.2.3. Bestimmung von Phagentitern	51
2.2.2.4. Test auf MMS-Sensitivität	51
2.2.2.5. Glyzerinkultur	51
2.2.3. Klonierung in Plasmide	52
2.2.3.1. Restriktion und Ligierung	52
2.2.3.2. Transformation von E. coli	52
2.2.4. Klonierung in lambda-Phagen	53
2.2.4.1. Restriktion und Ligierung	53
2.2.4.2. Verpackung von DNA in vitro	53
2.2.4.2.1. Frier-Tau-Lysat ("freeze thaw lysate", FTL)	53
2.2.4.2.2. Ultraschallextrakt ("sonic extract", SE)	54
2.2.4.2.3. Verpackung und Ausplattieren	55
2.2.4.3.4. Plaque-Hybridisierung	55
2.2.5. Zellkultur	56
2.2.6. Transfektion eukaryotischer Zellen	56
2.2.6.1. Radioimmunassay für HBsAg	57
2.3. Sicherheit	58
2.4. Abkürzungen	58

3.	ERGEBNISSE	60
3.1.	Integrierte HBV-DNA im Genom der PLC/PRF/5-Zelllinie	60
3.2.	Klonierung der integrierten HBV-DNA	62
3.2.1.	Bakteriophage lambda als Vektor	63
3.2.2.	Optimierung der Klonierung	66
3.2.3.	Klonierungsergebnisse	69
3.3.	Restriktionskartierung der Klone	71
3.3.1.	Kartierung von A-4,0	71
3.3.2.	Kartierung von A-10,5	77
3.4.	Struktur der viralen DNA	81
3.4.1.	Deletion in A-6,0	84
3.4.2.	Nachweis einer unerwarteten, viralen Hind III-Stelle in A-4,0, A-10,5 und A-10,7	84
3.4.3.	Bestimmung des HBV Subtyps	88
3.4.4.	Bestimmung der viralen-humanen Übergänge	89
3.4.5.	Restriktionskarten der integrierten HBV-DNA	98
3.4.6.	Nachweis der Echtheit der Klone	99
3.4.7.	Struktur der unklonierten Fragmente mit integrierter HBV-DNA	103
3.5.	Integrationsstellen	110
3.5.1.	Sequenzen an den Integrationsstellen	110
3.5.2.	Homologien zwischen viralen und humanen Sequenzen	111
3.5.3.	Integrationsstellen im humanen Genom	114
3.6.	Transkription und Translation der klonierten Fragmente	116
3.6.1.	HBs Gen	117
3.6.1.1.	Expressionssignale	117
3.6.1.2.	Ergebnisse im Ltk-System	118
3.6.1.3.	Diskussion der HBsAg-Expression	118
3.6.2.	HBc Gen	119
3.6.2.1.	Expressionssignale und Ergebnisse im Ltk-System	119
3.6.3.	Expressionssignale in den humanen Sequenzen	120
3.7.	Onkogene Eigenschaften der klonierten Fragmente	122
3.7.1.	Transfektion von NIH3T3-Zellen	122
3.7.2.	Suche nach bekannten Onkogenen	124

4.	DISKUSSION	131
4.1.	Struktur der integrierten HBV-DNA	131
4.2.	Integration von HBV-DNA	133
4.2.1.	Integration im Vergleich zu anderen Viren	133
4.2.2.	Modell zur Integration von HBV-DNA	134
4.3.	Onkogene Effekte bei der Integration von HBV-DNA	138
4.3.1.	Enthält HBV ein Onkogen?	138
4.3.2.	Integriert HBV in der Nähe eines zellulären Onkogens?	139
4.3.3.	Zerstörung eines humanen Gens	140
4.3.4.	Stimulation eines humanen Gens	141
4.3.5.	Amplifikation und Rearrangement	143
4.3.6.	Mögliche onkogene Mechanismen der integrierten HBV-DNA	145
5.	LITERATUR	150
	DANKSAGUNG	167
	LEBENS LAUF	168

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 wurden vier DNA-Fragmente mit integrierter DNA des Hepatitis-B-Virus (HBV) kloniert. Die Struktur der viralen und zellulären Sequenzen wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen, Hybridisierungstechniken und DNA-Sequenzierung charakterisiert. Große Teile der viralen DNA sind kolinear mit den publizierten HBV-Genomen. Ausnahmen stellen in einem Fall eine Inversion und eine Duplikation, in einem anderen Fall eine Deletion dar. Im Gegensatz dazu ist die integrierte, virale DNA des verwandten Woodchuck-Hepatitis-Virus so stark verändert, daß die viralen Gene zerstört sind.

Die humanen DNA-Sequenzen der vier Klone sind voneinander verschieden. Zwei der Klone enthalten allerdings neben unterschiedlicher, singulärer auch ähnliche, repetitive humane DNA. Eine weitere Einschränkung ist in zwei anderen Fällen zu machen. Diese beiden klonierten Fragmente weisen identische, humane DNA-Sequenzen von 187 bp Länge auf, welche die Integrationsstelle direkt flankieren. Auch die viralen Integrationsstellen selbst sind in diesen beiden Klonen identisch. Aus der Analyse unklonierter HBV-Integrate ergibt sich, daß andere DNA-Fragmente ebenfalls gleiche, die HBV-DNA flankierende Sequenzen enthalten. Das läßt auf Amplifikation von viraler und humaner DNA schließen, der entweder Transpositionen oder große Deletionen an zellulärer DNA folgten. Einer der untersuchten Klone weist darauf hin, daß auch als direkte Folge der Integration von HBV-DNA humane DNA deletiert werden kann.

Nach Transfektion der Klone in Ltk-Zellen wurde in drei der vier Fälle das virale Oberflächenprotein (HBsAg) nachgewiesen. Die für die Expression von HBsAg notwendige mRNA reicht bis in die humanen Bereiche der klonierten Sequenzen. Da der HBs-Promotor stark und konstitutiv ist, könnten diese chimären Transkripte zur erhöhten Expression zellulärer Gene führen.

Es kann ausgeschlossen werden, daß HBV selbst für ein onkogenes Protein kodiert. Jedoch könnten durch die Integration viraler DNA Gene deletiert oder zerstört werden. Auch die Stimulierung eines humanen Gens durch einen Promotor des integrierten Virus könnte an der Tumorgenese beteiligt sein. Auf Grund der DNA-Sequenzanalyse könnten neben rein human kodierten Proteinen auch Fusionsproteine, die virale und humane Anteile enthalten, unter dem Einfluß des HBs-Promotors exprimiert werden. Amplifikation und Rearrangement der HBV-DNA und der flankierenden, humanen Sequenzen schaffen immer neue Situationen für diese Mechanismen.

1. EINLEITUNG

1.1. Hepatitis-Viren

Viele Allgemeininfektionen beim Menschen üben auch Effekte auf die Leber aus. Die dabei auftretenden Leberschädigungen haben jedoch meist untergeordnete Bedeutung für das Krankheitsbild. Beispiele für virale Erreger solcher Krankheiten sind Herpesviren, Coxsackie-Virus und Gelbfieber-Virus (Eisenburg 1982-1983). Unter humanen Hepatitis-Viren im engeren Sinne werden dagegen Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-B-Virus (HBV) und Non-A-Non-B-Virus (NANB) verstanden. Sie sind für die Mehrzahl der klinisch bedeutsamen, akuten und chronischen Leberentzündungen verantwortlich. Außer der viral bedingten Hepatitis können Entzündungen der Leber auch durch chemische Einflüsse, wie durch hohe Dosen an Alkohol, hervorgerufen werden.

1.1.1. Hepatitis-A-Virus

Hepatitis-A-Virus (HAV), der Erreger der infektiösen Hepatitis, ist ein Picorna-Virus aus der Enterogruppe. Sein 27 bis 29 nm messendes, kubisches Nukleokapsid enthält einzelsträngige RNA von 1,9 Md (McCollum & Zuckerman 1981) und kommt nur in einem Serotyp vor. Die Übertragung dieses Virus erfolgt überwiegend durch Schmutz- oder Schmier-Infektion, d.h. auf fäkal-oralem Weg. Die Krankheit verläuft zu 95% subklinisch. In den restlichen Fällen treten nach einer Inkubationszeit von 20 bis 45 Tagen die ersten Symptome auf. Die HAV-Infektion zeigt einen akuten Verlauf, sie wird nie chronisch. Die Durchseuchung der Bevölkerung beträgt weltweit, gemessen am Antikörpertiter, 80% bis 90%. In der BRD werden derzeit etwa 22.000 akute HAV-Neuerkrankungen gemeldet, was 36 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner entspricht.

1.1.2. Hepatitis-B-Virus

Hepatitis-B-Virus (HBV), auch Serum-Hepatitis-Virus genannt, gehört wegen seiner strukturellen Besonderheiten zu einer eigenen Gruppe, den Hepadna-Viren. Das 42 nm große, kugelförmige Dane-Partikel wurde 1970 von Dane und ihren Mitarbeitern als der infektiöse Erreger beschrieben und trägt deshalb heute ihren Namen. Seine Oberfläche enthält neben zellulären Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten (Gerin & Shih 1978) das Hepatitis-B-Oberflächen(Surface)-Antigen (HBsAg), das in mehreren Subtypen vorkommt. Neben einer gemeinsamen Determinante a sind durch Kombination mit den Subdeterminanten d, r, w und y verschiedene Subtypen wie adr, adw, ayr und ayw möglich. Im Inneren der HBsAg tragenden Hülle liegt das 27 nm große (Cohen & Richmond 1982) Kapsid, das aus Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg) besteht und eine teilweise doppelsträngige, zirkuläre DNA von 3,2 kb enthält. Dieses kleine Genom macht HBV zum kleinsten bekannten, animalen DNA-Virus. Weitere Bestandteile des Kapsids sind das HBeAg, ein virus-kodiertes Protein, eine spezifische DNA-Polymerase (Robinson 1977, Hess et al. 1981), ein an die virale DNA kovalent gebundenes Protein (Gerlich & Robinson 1980) und eine Proteinkinase, die das HBcAg phosphoryliert (Albin & Robinson 1980, Gerlich et al. 1982). Von den drei letzten ist nicht bewiesen, ob sie vom Virus oder von der Zelle kodiert sind.

HBV wird parenteral durch kontaminiertes Blut übertragen. Nach einer Inkubationszeit von 40 bis 160 Tagen kommt es bei 50% der Infizierten zu einem klinischen, akuten Verlauf der Krankheit. Nur in sehr wenigen Fällen ist die Infektion fulminant und kann dann unbehandelt zum Tod des Patienten führen. In 5-10% aller Fälle kann das Virus nicht innerhalb von sechs Monaten eliminiert werden. Es stellt sich ein chronisches Trägerstadium ein, das vielfach zu einer chronischen Hepatitis führt, die entweder chronisch-persistierend oder chronisch-aggressiv sein kann. Beim

chronisch-aggressiven Verlauf ist die Gefahr der Entstehung einer Zirrhose oder eines primären Leberkarzinoms groß. Daneben gibt es aber auch gesunde HBV-Träger. In allen chronischen Fällen ist HBsAg oft lebenslang im Serum nachweisbar. Weltweit wird mit 200 Millionen Virus-Trägern gerechnet. Die Durchseuchung der Bevölkerung ist in den westlichen Industrieländern mit 0,1-0,5% sehr gering, erreicht aber in Südostasien und im tropischen Afrika bis zu 30%.

Mit HBV assoziiert wurde das sogenannte delta-Antigen gefunden, das wahrscheinlich ein defektives RNA-Virus ist und sich nur mit Hilfe von HBV vermehren kann (Rizetto et al. 1980).

1.1.3. Non-A-Non-B-Virus

Die Erreger der Non-A-Non-B(NANB)-Hepatitis können bisher nicht genau charakterisiert werden. Definitionsgemäß haben sie nur gemeinsam, daß sie Hepatitis auslösen, aber keine mit HAV und HBV assoziierten Antigene oder Antikörper nachweisbar sind. In diese Gruppe gehören wahrscheinlich mehrere Viren. Darauf weisen schon die verschieden langen Inkubationszeiten hin, die beim Kurzzeit-Typ zwischen 20 und 60 Tagen, beim Langzeit-Typ zwischen 80 und 150 Tagen liegen. Die NANB-Hepatitis ist heute nach weitgehender Eliminierung HBV-kontaminierter Blutkonserven die häufigste Form der posttransfusionellen Hepatitis. Sie führt in relativ hohen Maße (8-62%) zum chronischen Stadium. Das Mortalitätsrisiko ist mit 2% höher als bei HAV und HBV (jeweils 1%).

1.2. Hepatitis-B-Virus und primäres Leberkarzinom

Das primäre Leberkarzinom (PLC) hat großes medizinisches Interesse auf sich gezogen. Denn dieser Tumor, der relativ

selten in Europa und Nordamerika vorkommt, ist einer der häufigsten in Südostasien, besonders in China und Taiwan, und außerdem in großen Teilen Schwarzafrikas. Für PLC liegt die Sterberate in diesen Ländern zwischen 25 bis 150 pro 100.000 Einwohnern, was weltweit gesehen pro Jahr 500.000 bis 1 Million Todesfälle bedeutet (Blumberg & London 1980).

Da ein kausaler Zusammenhang zwischen PLC und HBV vermutet wird, hat dieses Virus ebenfalls besondere Bedeutung gewonnen. In der Tat gibt es viele Hinweise auf eine enge Beziehung zwischen Virus und Wirt. So ergibt der Vergleich der weltweiten Verbreitung von HBV und PLC einen hohen Grad an Übereinstimmung (Abb. 1; Szmuness et al. 1978, Sobeslavsky 1978). PLC kommt also gerade in den Gebieten gehäuft vor, in denen auch ein hoher Anteil an HBV-Trägern vorhanden ist.

Eine traditionelle epidemiologische Methode ist der Vergleich der Krankheitsfälle mit gesunden Kontrollen. Solche Studien ergaben, daß z.B. in Vietnam 80% der Patienten mit PLC auch HBsAg-positiv sind, während in der Kontrollgruppe nur 25% positiv sind (Szmuness et al. 1978). Ähnliche Verhältnisse werden auch in Ländern wie der Schweiz (Pirovino et al. 1983) gefunden, wo HBV und PLC nicht so gehäuft auftreten wie in Südostasien und Afrika. Wenn eine persistente HBV-Infektion aber wirklich das kausale Agens für das Leberkarzinom sein sollte, müßte die Infektion dem Auftreten des PLC vorangehen. In einer Langzeitstudie konnten Beasley et al. (1981) das für Taiwan feststellen: Von 3.454 HBsAg-positiven Personen erkrankten 70 an PLC, während unter 19.253 HBsAg-negativen Kontrollpersonen nur ein einziger ein PLC entwickelte. Das bedeutet für HBV-Träger ein um den Faktor 390 erhöhtes PLC-Risiko. Für einen männlichen HBV-Träger in Taiwan ist die Chance an Leber-Zirrhose oder an einem PLC zu sterben 40-50% (Beasley 1982).

HBV ist ein DNA-Virus. Da viele DNA-Viren, darunter auch



A schematic map of worldwide distribution of HBsAg.

Szmunn et al. 1978



World distribution of primary liver cancer

Sobeslavsky 1978

Abb. 1: Verbreitung von HBsAg und primärem Leberkarzinom

Die Abbildungen der weltweiten Verbreitung von HBsAg und primärem Leberkarzinom sind den Veröffentlichungen von Szmunn et al. (1978) bzw. Sobeslavsky (1978) entnommen. Im südlichen Teil Afrikas und in Südostasien kommt sowohl das Hepatitis-B-Virus (gemessen an HBsAg) als auch das primäre Leberkarzinom gehäuft vor.

tumorauslösende Viren, in das Genom der Wirtszelle integrieren, wurde auch bei HBV nach Integration gesucht. Tatsächlich konnten in der genomischen DNA infizierter humaner Leberzellen im Fall akuter und chronischer Hepatitis (Brechot et al. 1981), bei Zirrhose (Koshy et al. 1981) und PLC (Brechot et al. 1980, Chakraborty et al. 1980, Edman et al. 1980, Koshy et al. 1981) integrierte HBV-DNA-Kopien gefunden werden.

Ein weiterer Hinweis für einen Zusammenhang zwischen Virus und Karzinom ergaben Untersuchungen am Woodchuck (*Marmota monax*), einem amerikanischen Verwandten des Murmeltiers. Woodchucks können Lebertumoren entwickeln und in tumortragenden Tieren wurden unerwarteterweise auch Hepatitis-Viren gefunden, die sehr große Ähnlichkeit mit HBV aufweisen (Summers et al. 1978). Vergleichbar mit dem Menschen gibt es auch beim Woodchuck chronische Hepatitis und Zirrhose, die als Vorstufen zum Karzinom angesehen werden.

All diese Befunde weisen unübersehbar auf eine Korrelation zwischen Virus und Karzinom hin, einen direkten Beweis für HBV als kausale Ursache des PLC erbringen sie jedoch nicht. Zum Beispiel sind die so beweiskräftig erscheinenden Übereinstimmungen in der Verbreitung von HBV und PLC besonders angreifbar (DeLong 1982). In den Gebieten mit hoher PLC-Inzidenz ist wegen des tropischen Klimas auch die Gefahr des Verderbens von Lebensmitteln, z.B. durch Schimmelpilze, groß. Die von den Pilzen ausgeschiedenen Aflatoxine sind bekannt für ihre leberschädigende Wirkung (Peers & Linsell 1975). Möglicherweise sind an der Tumorgenese mehrere Faktoren beteiligt, von denen HBV aber vielleicht der ausschlaggebende ist.

Beweise können also die epidemiologischen Daten nicht erbringen. Diese müssen vielmehr in direkten Experimenten an geeigneten Modellsystemen gesucht werden. Dazu ist auch die Kenntnis der Biologie des HBV nötig, deren Untersuchung erst

in den letzten Jahren möglich wurde. Die folgenden Kapitel sind deshalb diesem Thema gewidmet.

1.3. Genom des HBV

Im Dane-Partikel liegt das virale Genom in Form von teilweise doppelsträngiger DNA vor. Während ein DNA-Strang (langer Strang oder auch Minus-Strang genannt, und für alle bekannten viralen Proteine kodierend) bis auf einen Strangbruch an einer bestimmten Stelle, dem "nick", vollständig ist, variiert die Länge des anderen Stranges (kurzer Strang oder Plus-Strang), so daß 10-60% der DNA einzelsträngig bleiben. Dieser einzelsträngige Bereich wird "gap" genannt. Dabei fällt die Position des 5'-Endes des kurzen Strangs immer in einen bestimmten Bereich, während das 3'-Ende sehr variabel ist. Die 5'-Enden der beiden Stränge sind durchschnittlich 200 bp voneinander entfernt (Abb. 2; Delius et al. 1983).

Da genomische DNA der Subtypen adr (Fujiyama et al. 1983, Ono et al. 1983), adw (Ono et al. 1983), adw₂ (Valenzuela et al. 1980), adyw (Pasek et al. 1979) und ayw (Galibert et al. 1979) kloniert und sequenziert ist, konnten außer Restriktionskarten auch die genaue Lage der Leserahmen, sowie ihre Transkriptionssignale ermittelt werden (Abb. 2, 3). Obwohl in den DNA-Sequenzen der einzelnen Subtypen Unterschiede auftreten, die sich auch in den Restriktionskarten niederschlagen, befinden sich auf dem Minus-Strang all dieser HBV-Genome an den gleichen Positionen vier große Leserahmen (Die einzige virale Eco RI-Schnittstelle dient dabei als Position 0. Als Referenzgenom wurde das Genom des Subtyps adw₂ gewählt, da es die größte Länge aufweist; Abb. 2, 3). Ein Leserahmen konnte dem HBsAg (Position 157-884) ein anderer dem HBcAg (Position 1903-2457) zugeordnet werden. Da HBcAg nach Proteasebehandlung HBe-Antigenität aufweist, wird vermutet, daß HBeAg ein Spaltprodukt von HBcAg darstellt. Daraus folgt, daß HBeAg im selben Leserahmen

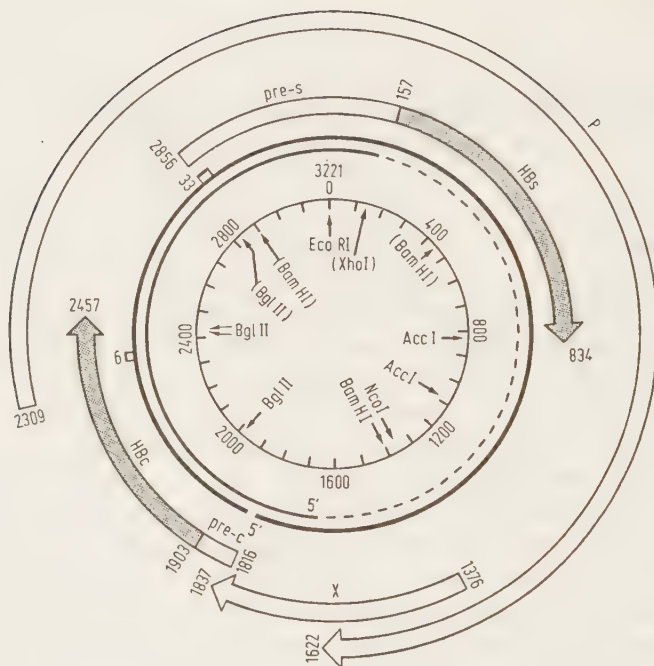


Abb. 2: Genkarte des Hepatitis-B-Virus, Subtyp adw_2

Im Virion, dem Dane-Partikel, liegt das Genom des HBV als zirkuläre, teilweise doppelsträngige DNA vor. Das ist schematisch durch die fett gezeichneten Linien dargestellt. Die variable Ausdehnung des einzelsträngigen Bereichs ist durch die unterbrochene, fette Linie angedeutet. Das Genom des Subtyps adw_2 (Valenzuela et al. 1980) hat im Vergleich zu dem der anderen Subtypen 33 und 6 zusätzliche Basenpaare, deren Lage gekennzeichnet ist. Innerhalb der schematischen Darstellung des DNA-Moleküls sind die Kartenpositionen in Basenpaaren und einige Restriktionsstellen angegeben. Die einzige Schnittstelle für Eco RI wurde als Position 0 gewählt. Die in Klammern gesetzten Restriktionsstellen werden im Subtyp ayw (Galibert et al. 1979) gefunden. Die großen Pfeile repräsentieren die Leserahmen HBC, HBs, P und X. Vor den Leserahmen HBc und HBs (getüpfelt) befinden sich noch diejenigen der pre-c- und pre-s-Region. Die Kartenpositionen der Anfangs- und Endbasenpaare der Leserahmen sind zusätzlich angegeben.

wie HBcAg kodiert ist. Unklar ist jedoch, wie es zu den unterschiedlichen Antigenitäten von HBcAg und HBeAg kommt.

Die Funktion der übrigen Leserahmen ist nicht klar. Der größte (P; Position 2309-1622) kodiert möglicherweise für die DNA-Polymerase, von dem mit X bezeichneten (Position 1376-1837) wird vermutet, daß sein Translationsprodukt das Protein sein könnte, das kovalent an das 5'-Ende des langen Minus-Strangs gebunden ist (Molnar-Kimber et al. 1983). Von beiden Leserahmen konnte bisher kein Translationsprodukt nachgewiesen werden, obwohl das X-Gen in einem Rattenzellsystem transkribiert wird (Gough 1983).

Auf dem Plus-Strang befinden sich nur relativ kurze Leserahmen, von denen bisher angenommen wurde, daß sie nicht translatiert werden (Tiollais et al. 1981). In vitro ist immerhin die Transkription eines dieser Leserahmen möglich (Standring et al. 1983).

1.3.1. Transkription und Expression viraler Proteine

Transkription und Expression soll nur für die beiden mit HBsAg und HBcAg identifizierten Leserahmen dargestellt werden. Beide Leserahmen haben die Eigenheit, daß nicht, oder jedenfalls nicht ausschließlich, das erste AUG den Start für die Translation darstellt. Es gibt daher vor dem eigentlichen HBs- und HBc-Gen eine pre-s- (Beginn bei Position 2856) bzw. eine pre-c-Region (Beginn bei Position 1816).

Für das HBs-Gen sind zwei Promotoren bekannt. Eine TATA-Box (TATAAG, Position 2786-2791; Pourcel et al. 1982, Gough 1983, Rall et al. 1983) 592 bp vor dem HBs-Gen und ein dem späten Promotor des SV40 ähnlicher (CCTACTCC, Position 3168-3175; Cattaneo et al. 1983) 210 bp vor dem Gen. Die TATA-Box liegt noch vor der pre-s-Region, während der SV40-ähnliche Promotor in dieser Region liegt. Durch

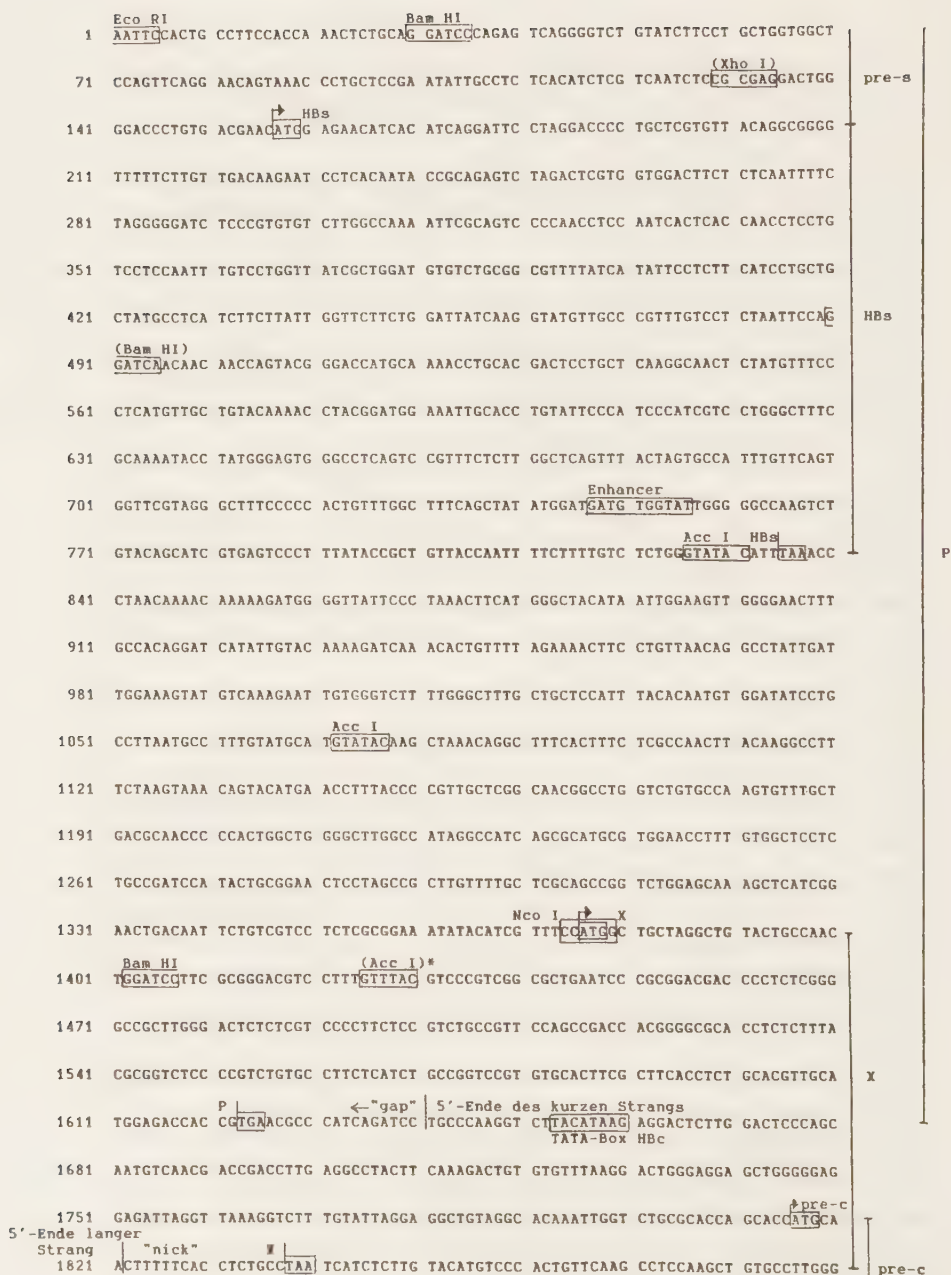


Abb. 3

1891 TGGCTTTGGG ^{Hbc} GATGACAT TGACCTTAT ^{Poly(A)} AAGAATTG GAGCTACTGT GGAGTTACTC TCGTTTTTGC
 1961 CTCTGACTT CTTTCCTTCC GTCA ^{Bgl II} GATC TCTAGACAC CGCCTCAGCT CTGTATCGAG AAGCCTTAGA
 2031 GTCTCTGAG CATTGCTCAC CTCACCATAC TGCACTCAGG CAAGCCATTC TCTGCTGGGG GGAATTGATG
 2101 ACTCTAGCTA CCTGGGTGGG TAATAATTG GAAGATCCAG CATCTAGGGA TCTGTAGTA AATTATGTTA
 2171 ATACTAAGCT GGGTTTAAAG ATCAGGCAAC TATTGTGGTT TCA ^{TATA-Box P} TATCTT TGCCTTACTT TTGGAAGAGA Hbc
 2241 GACTGTACTT GAATATTG GTCYTTTCGG AGTGTGGATT CGCACTCCTC CAGCCTATAG ACCACCAAT ^P
 2311 ^{zusätzliche 6 bp} GCCCCATCT TATCAACACT TCCGGAAACT ACTGTTGTTA GACGACGGGA CCGAGGCAGG TCCCCTAGAA
 2381 GAAGAACTCC CTCGCTCGC AGACGG ^{Bgl II} AGAT CTCCATCGCC GCGTCGCAGA ^{Bgl II} AGATCTCAAT CTCGGGAATC
 2451 ^{Hbc} TCAATGT ^{AG} TATTCTTTGG ACTCATAAGG TGGGAAACTT TACGGGGCTT TATTCTCTA CAGTACCTAT
 2521 CTTTAACTCT GAATGGCAA CTCCTTCCTT TCCTAAGATT CATTACAAG AGGACATTAT TAATAGGTGT
 2591 CAACAATTG TGGGCCCTCT CACTGTAAAT GAAAAGAGAA GATTGAAATT AATTATGCCT GCTAGATTCT
 2661 ATCCTACCCA CACTAAATAT TTGCCCTTAG ACAAGGAAT TAAACCTTAT TATCCAGATC AGGTAGTTAA
 2731 TCATTACTTC CAAACCAGAC ATTATTACA TACTCTTTGG AAGGCTGGTA TTCTATATA ^{TATA-Box Hbs} GCGGGAACC P
 2801 ACACGTAGCG CATCATTTT CGGGTCACCA TATTCTTGGG AACAAGAGCT ACAGCATGG ^{pre-s} AGGTTGGTCA
 2871 ^{zusätzliche 33 bp} TCAAAACCTC GCAAAGGCAT ^{Bam HI} GGGACGAAT CTTTCTGTT CCAATCCTCT GGGATTCTTT CCCGATCATC
 2941 AGT ^{Bam HI} GGACCC TGCATTGCGA GCGAACTCAA ACAATCCAGA TTGGGACTTC AACCCCGCTA AGGACGACTG
 3011 GCCAGCAGCC AACCAAGTAG GAGTGGGAGC ATTCGGGCGA AGGCTCACC CTCCACACGG CGGTATTTTG pre-s
 3081 GGGTGGAGCC CTCAGGCTCA GGGCATATTG ACCACAGTGT CAACAATCC TCCTCCTGCC TCCACCAATC
 3151 GGCAGTCAGG AAGGCAGC ^{SV40 ähnlicher Promotor Hbs} CCACTCTCT AAGAGACAGT CATCCTCAGG CCATG ^{pre-s} AGTG
 3221 ^{Eco RI} G

Abb. 3: Nukleotidsequenz des Hepatitis-B-Virus, Subtyp adw₂. Die Sequenz des Subtyps adw₂ (Valenzuela et al. 1980) ist in 5'-3'-Richtung geschrieben. Die Kartenpositionen entsprechen denjenigen in Abbildung 2. Die Restriktionsenzyme in Klammern, z.B. (Xho I), werden im Subtyp ayw (Galibert et al. 1979), die mit einem Stern gekennzeichneten, z.B. (Acc I)*, im Subtyp adr (Fujiyama et al. 1983, Ono et al. 1983) gefunden. Angegeben sind außerdem die Ausdehnung der Leserahmen pre-c, Hbc, pre-s, Hbs, P und X, sowie Promotoren, Enhancer, Poly(A)-Signal, 5'-Enden des langen und des kurzen Strangs und die im Subtyp adw₂ zusätzlichen 33 bzw. 6 Basenpaare.

Sl-Kartierung der mRNA wurde gezeigt, daß der überwiegende Teil der Transkripte vom SV40-ähnlichen Promotor startet. Diese mRNA ist 2,1 kb lang und wird nicht "gespleit", enthält also keine Introns (Cattaneo et al. 1983). Splicing von HBs-mRNA konnte jedoch von Simonsen & Levinson (1983) durch Untersuchung von cDNA-Klonen HBs-spezifischer mRNA nachgewiesen werden.

Die HBs-Transkription ist sehr stark und konstitutiv (Malpiece et al. 1983), was zu hoher Expression an HBsAg führt. Diese Überproduktion erklärt auch den Fund von 22 nm Partikeln und schlauchförmigen Strukturen von 22 nm Durchmesser und einer Länge von 50 bis über 230 nm, die HBsAg aber kein HBcAg und keine DNA enthalten. Das Verhältnis von 42 nm Dane-Partikeln zu den 22 nm Partikeln und den tubulären Formen beträgt 1 : 1730 : 120 (Bond & Hall 1972).

Für das HBc-Gen wird die TATA-ähnliche Sequenz TACATAAG, 249 bp vor dem Gen als Promotor angesehen (Position 1653-1660; Valenzuela et al. 1980, Rall et al. 1983). Dieser Promotor ist im Vergleich zu den HBs-Promotoren schwach, und möglicherweise fungiert er in vivo garnicht als Promotor. Denn Gough (1983) konnte zeigen, daß ein Transkript, das vor dem HBs-Gen beginnt und auch das HBc-Gen beinhaltet, zur Expression von HBcAg führt. Die Transkription des HBcAg selbst scheint durch Methylierung des Gens reguliert zu sein (Yoakum et al. 1983).

Das HBV-Genom enthält nur ein Signal für die Polyadenylierung (TATAAA, Position 1918-1923; Cattaneo et al. 1983), die im HBc-Gen liegt. Das erklärt, warum die HBs-mRNA ungefähr 1 kb länger als das eigentliche HBs-Gen ist. Ebenfalls wird verständlich, daß zur Expression von HBcAg eine mRNA notwendig ist, die größer als das HBV-Genom ist (Gough 1983). Diese kommt dadurch zustande, daß bei der mRNA-Synthese das Poly(A)-Signal einmal überlesen wird und erst beim zweiten Mal zur Beendigung der Transkription

führt. Auf diese Weise wird das HBc-Gen einmal vollständig transkribiert.

Die Molekulargewichte der HBsAg-Proteine sind unterschiedlich. So werden Größen von 24 kd, 28 kd, 32 kd, 35 kd, 43 kd und 51 kd gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß es Translationsprodukte gibt, die zusätzlich die von der pre-s-Region kodierte Peptidsequenz enthalten (Stibbe & Gerlich 1983). Vor dem AUG des HBs-Gens liegen noch zwei weitere Startkodons; durch die dann bereits das Auftreten von insgesamt drei unterschiedlich großen Proteinen erklärt wird. Da die Proteine jeweils glykosyliert und unglykosyliert vorkommen, werden die sechs Proteingrößen verständlich (Sibbe & Gerlich 1983; Feitelson et al. 1983).

Das HBcAg hat eine Größe von 19 kd. Aber auch beim HBc-Gen kann der pre-c-Bereich translatiert werden, was zu einem Protein führt, das starke HBe-Antigenität aufweist. Da die HBe- und HBc-Antigenität nicht im Bereich des pre-c liegen, ist die unterschiedliche Ausprägung der beiden Antigenitäten vermutlich in einer veränderter Sekundärstruktur zu suchen (Gerlich; mündliche Mitteilung).

HBeAg kann in unterschiedlicher Größe auftreten (Vyas et al. 1977). Die Ursache der verschieden großen Moleküle liegt möglicherweise in der Komplexbildung mit Plasmaproteinen.

HBcAg wird vorwiegend in den Kernen von infizierten Hepatozyten, HBsAg dagegen im Zytoplasma und auf den Zelloberflächen gefunden. HBeAg kommt nur im Serum vor.

1.3.2. Replikation des HBV

Die Replikation des HBV ist sehr ungewöhnlich. An dem verwandten "duck hepatitis B virus" (DHBV) der Peking-Ente wurde gezeigt (Summers & Mason 1982), daß die DNA-Replikation über eine RNA-Zwischenstufe verläuft; die zur

Unterscheidung von viraler mRNA Prä-Genom genannt wird. Das Template des Prä-Genoms könnte sowohl die geschlossene zirkuläre, virale DNA sein, die im Kern gefunden wird, oder auch die im zellulären Genom integrierte virale DNA. Für das DHBV wurde Integration allerdings noch nicht nachgewiesen.

Die prä-genomische RNA wird in das noch unreife Kapsid verpackt. Gleichzeitig wird an dieser RNA die Minus-Strang-DNA transkribiert. Vermutlich startet die Synthese des Minus-Strangs an dem Protein, das später kovalent gebunden am kompletten Minus-Strang gefunden wird. Welches Enzym den Minus-Strang synthetisiert, ist nicht klar, denn für die im Kapsid befindliche DNA-Polymerase konnte bisher keine Reverse-Transkriptase-Aktivität nachgewiesen werden. Sicher dagegen ist, daß nach der Degradation des Prä-Genoms diese DNA-Polymerase den DNA-Plus-Strang synthetisiert. Wahrscheinlich gleichzeitig wird das Kapsid strukturell verändert und damit reif für die Verpackung. Die Kapside werden dazu aus dem Kern ausgeschleust und im Endoplasmatischen Retikulum in die äußere Hülle verpackt. Ein Teil dieser an DHBV gewonnen Ergebnisse wurde 1984 von Fowler et al. für das humane HBV bestätigt.

Das Virus weist außer der Transkription von RNA in DNA noch andere Ähnlichkeiten mit Retroviren auf. So sind in beiden Fällen (wenn man bei HBV von den kurzen Leserahmen auf dem Plus-Strang absieht) die Gene unidirektional angeordnet, d.h. nur ein Strang kodiert. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, daß durch das Aufschmelzen der "nick-gap-Struktur" bei HBV-DNA überstehende Enden von rund 200 bp entstehen könnten, die dann direkte terminale Duplikationen, ähnlich den "long terminal repeats" (LTR) der Retroviren, darstellen würden. Zu der Spekulation, daß die vermuteten terminalen Duplikationen im HBV-Genom ebenfalls eine Rolle bei der Integration in das zelluläre Genom spielen könnten, nimmt auch diese Arbeit durch ihre Ergebnisse Stellung.

1.4. Wechselwirkungen zwischen HBV und Zelle

1.4.1. Akute und chronische HBV-Infektionen

Das Zustandekommen der unterschiedliche Verlaufsarten einer Hepatitis-B-Infektion ist noch nicht völlig geklärt. Wie bereits geschildert, kann die akute Form Variationen von einem subklinischen bis zu einem fulminanten Verlauf zeigen. Die Infektion kann außerdem entweder nur akut sein oder anschließend in eine chronische übergehen, die wiederum chronisch-persistierend oder chronisch-aggressiv verlaufen kann.

Denkbar ist, daß die verschiedenen Typen der Infektion virusbedingt sind. So könnten Mutationen im HBV-Genom für einen bestimmten Krankheitsverlauf verantwortlich sein. Allerdings werden bei den verschiedenen HBV-Subtypen und auch innerhalb eines Subtyps schon deutliche Sequenzunterschiede gefunden, ohne daß dies mit dem Verlauf der Krankheit korreliert werden könnte. Aber auch die Virushülle, die ja neben dem viralen HBsAg auch noch zelluläre Komponenten enthält, könnte die unterschiedlichen Krankheitsbilder bestimmen.

Während über den virusbedingten Krankheitsverlauf bisher nur spekuliert wird, gilt es als sicher, daß die genetische oder physiologische Situation eines Menschen einen großen Einfluß auf den Verlauf der HBV-Infektion ausüben kann (Bianchi & Gudat 1979). So besteht bei HBsAg-Trägern in der Regel eine verminderte zellvermittelte Immunität. Bei immundefizienten Personen kann HBsAg und HBeAg gleichzeitig positiv und damit das Blut hochinfektiös sein, ohne daß ein morphologisch faßbares, chronisches Leberleiden vorliegt (Eisenburg 1982-1983).

Für die Zerstörung infizierten Leberzellen mit Antigen-Expression scheinen vor allem T-Zellen verantwortlich zu sein. T-Zellen sollen die infizierte Hepatozyten am

HBcAg erkennen, das außer im Kern auch in geringen Konzentrationen auf der Zellmembran auftritt, und sie dann lysieren (Thomas et al. 1982). Für diesen Vorgang benötigen T-Zellen eine positive Kooperation zwischen Oberflächen-Antigen-Rezeptoren und bestimmten Proteinen des Histokompatibilitätskomplexes (HLA; Doherty et al. 1977). Im Fall der chronisch-aggressiven Hepatitis kommen tatsächlich bestimmte HLA-Proteine vermehrt vor (Dumble & MacKay 1977).

Die Stärke der Immunreaktion kann das Auftreten der verschiedenen Krankheitsverläufe erklären: Ist sie stark, zerstört sie in kurzer Zeit alle infizierten Zellen, eliminiert damit das HBV und erlaubt somit nur die akute Infektion mit anschließender Ausheilung. Ein defektes Immunsystem kann das Virus nicht an der Vermehrung hindern, führt aber auch nicht zu Zellzerstörungen. Diese Situation scheint bei gesunden HBV-Trägern vorzuliegen. Ist das Immunsystem dagegen schwach, lysiert es immer nur einen Teil der HBV enthaltenden Zellen. In den übrigen vermehrt sich das Virus und kann somit immer weitere Hepatozyten infizieren. Die in diesem Fall auftretende, fortschreitende Zellzerstörung wird bei der chronisch-aggressiven Hepatitis gefunden. Die Zellyse wird durch die Teilung anderer Zellen teilweise kompensiert. Im Zuge der vermehrten Leberregenerierung könnten potentielle Tumorzellen zur Vermehrung stimuliert werden und so zum Leberkarzinom führen. Bei dieser Art der Karzinogenese hätte das HBV nur einen indirekten Effekt.

1.4.2. Mechanismen der malignen Transformation

Durch bisherige Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, daß HBV ein onkogenes Virus im engeren Sinne ist, wie etwa das Rous-Sarkoma-Virus (RSV). Das RSV-Genom enthält einen Leserahmen, der für ein onkogenes Protein kodiert. Ein solches Gen gibt es beim HBV nicht. Auch der Befund, daß HBV-Träger, die hohe Virus-Titer im Blut aufweisen, nicht

schnell Tumoren bekommen, weist auf das Fehlen eines Onkogens im HBV-Genom hin.

Eine Folge chronischer HBV-Infektion ist häufig die Integration von HBV-DNA in das Genom von Hepatozyten. Integration von viraler DNA kann aber durchaus zur malignen Transformation führen. Beispielsweise transformiert SV40 die Zelle nach Integration ins Wirtsgenom durch die Expression von viruskodiertem T-Antigen (Tooze 1980). Ein transformierendes Protein ist bei HBV allerdings nicht bekannt.

Aber schon die Integration allein kann zur Tumorbildung führen, wenn dabei ein zelluläres Gen zerstört wird, das eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des normalen Zustands der Zelle spielt. Eine anschließende Deletion, die virale und zelluläre DNA erfaßt, kann das Gleiche bewirken, nur der virale Effekt wäre nicht mehr nachzuweisen ("hit and run" Mechanismus). Das könnte erklären, daß in einigen Lebertumoren keine integrierte HBV-DNA gefunden wird.

Die Integration viraler DNA kann aber auch auf andere Weise Störungen auslösen. Erfolgt sie nämlich nicht in, sondern neben einem Gen, kann durch einen viralen Promotor oder Enhancer die Expression eines zellulären Gens stimuliert werden. Ist dieses Gen ein Onkogen, wird dadurch die maligne Transformation erklärbar.

In beiden Fällen muß die Integration aber in bestimmten Regionen des zellulären Genoms erfolgen, um ein für die Tumorauslösung wichtiges Gen zu beeinflussen. Das würde erklären, warum nur ein Teil der Virus-Träger überhaupt ein PLC entwickelt. Vorausgesetzt, daß HBV während der chronischen Infektion immer wieder integrieren kann, würde verständlich, warum die Entstehung des PLC unter Umständen erst viele Jahre nach der Infektion in Gang kommt. Um solche eventuell vorhandenen spezifischen Integrationsorte nachzuweisen, wurde von Brechot et al. (1981) und Koshy et al. (1981) die DNA aus verschiedenen PLC-Proben untersucht.

Im Fall spezifischer Integration werden gleich große Restriktionsfragmente mit integrierter HBV-DNA aus verschiedenen Gewebeproben erwartet. Von einer Arbeitsgruppe (Koshy et al. 1981) konnten tatsächlich gleich große HBV-spezifische Fragmente in der DNA aus unterschiedlichen PLC nachgewiesen werden. Die spezifische Integration ist aber erst dann bewiesen, wenn auch die DNA-Sequenz in diesen Fragmenten gleich ist, denn in der so komplexen, eukaryotischen DNA entstehen sehr viele Restriktionsfragmente gleicher Länge, aber unterschiedlicher Sequenz. Andererseits läßt sich durch das Fehlen gleich großer Fragmente nicht ausschließen, daß die virale Integration wenn nicht an gleicher Stelle, so doch im gleichen Bereich erfolgte. Denn bei Integration in einem direkt benachbarten Restriktionsfragment von anderer Größe könnte immer noch das selbe, für die Onkogenese wichtige Gen beeinflußt werden. Um solchen Fragestellungen nachgehen zu können, müssen die humanen Restriktionsfragmente in klonierter Form vorliegen.

All diese theoretischen Betrachtungen gewinnen bei Hepatozyten noch eine weitere Dimension. Denn in diesen Zellen brauchen nicht unbedingt Onkogene oder die für die Regulation von Onkogenen verantwortlichen Gene bei der Tumorgenese beteiligt sein. Hepatozyten produzieren und sekretieren nämlich immunregulatorische Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der Funktion der Suppressor-Zellen ausüben. Integrierte HBV-DNA könnte den hepatozellulären Metabolismus und damit die Produktion oder die Art dieser regulatorischen Moleküle stören, was schließlich auch zu Autoimmun-Reaktionen gegen spezifische Hepatozyten-Membran-Antigene führen könnte (Levy & Chisari 1981). Ein solcher Mechanismus ist durchaus im Bereich des Möglichen, wie der Nachweis der Dysfunktion von Suppressor-Zellen bei chronisch-aggressiver Hepatitis zeigt (Tavassolie & Kawanishi 1978). Die durch diesen Mechanismus in Gang gesetzte Zellzerstörung kann zur Zirrhose und nachfolgend zum PLC führen.

1.5. Untersuchungssysteme für HBV

Die epidemiologischen Daten können nur Hinweise für den Zusammenhang zwischen HBV und PLC geben. Ein Beweis für eine Kausalität kann vom molekularbiologischen Standpunkt aus nur erbracht werden, wenn in Zellkultur oder in animalen Systemen eine onkogene Potenz des HBV gezeigt werden kann. Die dafür verwendbaren Untersuchungssysteme werden im Folgenden dargestellt.

1.5.1. Infektion von Zellkulturen

Die klassische Untersuchungsmethode für Virus-Zell-Beziehungen sind Arbeiten mit Zellkulturen. Auf diese Weise konnten die onkogenen Eigenschaften von z.B. SV40 detailliert untersucht werden. Dieses Virus vermehrt sich in permissiven Affenzellkulturen. In nicht-permissiven Mauszelllinien führt es dagegen zur malignen Transformation (Tooze 1980). In diesen Systemen läßt sich durch Vergleiche verschiedener SV40-Mutanten die Rolle der einzelnen Genom-Bereiche für Replikation, Integration und Transformation studieren.

Da HBV sich nur in Hepatozyten vermehrt, diese sich aber bisher nicht in Kultur halten lassen, gibt es kein Zellsystem für die produktive Vermehrung von HBV. In den humanen Hepatomzelllinien, die teilweise noch Markerproteine von Hepatozyten exprimieren, repliziert sich das HBV auch nicht. Eine nicht-permissive Zelllinie, die das Virus zwar nicht repliziert aber von ihm transformiert wird, ist ebenfalls nicht bekannt.

1.5.2. Tiermodelle

Der Wirtsbereich des HBV ist sehr eng. Außer in seinem natürlichen Wirt, dem Menschen, vermehrt es sich nur in

höheren Primaten, wie z.B. dem Schimpansen (*Pan troglodytes*; Ruiz-Opazo et al. 1982, Monjardino et al. 1982, Will et al. 1982). Da die Haltung von Schimpansen teuer und aufwendig ist, verbieten sich großangelegte Versuche von selbst.

Als Modellsysteme bieten sich aber die nahe verwandten Hepatitis-Viren des amerikanischen Woodchucks (*Marmota monax*, ein Verwandter des Murmeltiers; Summers et al. 1978), des amerikanischen Erdhörnchens (*GroundSquirrel*, *Spermophilus beecheyi*; Marion et al. 1980) und der Peking-Ente (*Anas domesticus*; Mason et al. 1980) an. Diese drei Viren bilden mit HBV die Hepadna-Gruppe. Die von ihnen infizierten Tiere sind relativ problemlos zu halten, mit Ausnahme der Peking-Ente aber vor allem für amerikanische Wissenschaftler. Zu berücksichtigen ist außerdem, daß die in diesen Systemen gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Situation beim Menschen übertragbar sind. Denn von den drei Versuchstierarten entwickeln sich nur beim Woodchuck Lebertumoren. Und auch bei dieser Art konnten nie Lebertumoren bei experimentell infizierten Tieren induziert werden. Alle Tumorträger waren Wildfänge, die wahrscheinlich schon perinatal infiziert worden waren. Auch die Entstehungsdauer der Tumoren, die beim Menschen auf 10 bis 15 Jahre geschätzt wird, läßt sich nicht mit der beim Woodchuck vergleichen, denn diese Tiere werden selter älter als vier Jahre.

1.5.3. Humane Hepatomzelllinie mit integrierter HBV-DNA

HBV repliziert sich nur in Hepatozyten. Da sich diese Zellen nicht in Kultur halten lassen, ist es unmöglich, die HBV-Infektion und eine sich eventuell daran anschließende maligne Transformation in Zellkultur zu studieren. Diese experimentelle Schwierigkeit kann durch die Untersuchung von bereits mit HBV infizierten Lebertumorzellen umgangen werden. In einigen Fällen ist es gelungen, von solchen Zellen permanente Kulturen zu etablieren. Eine davon ist die

Zelllinie PLC/PRF/5, die für alle folgenden Versuche verwendet wurde.

Die Zelllinie PLC/PRF/5 wurde 1976 von Alexander und Mitarbeitern in Kultur gebracht. Die Zellen stammen aus Lebertumorgewebe, das bei der Autopsie eines 24-jährigen Schwarzen aus dem südlichen Afrika entnommen wurde. Die Zelllinie exprimiert einige für Hepatozyten typische Marker (Knowles et al. 1980). Auf den transformierten Zustand weist aber ein abnormaler Karyotyp von 48 bis 61 Chromosomen hin. Auffällig ist dabei der Verlust von Chromosomen der D- und G-Gruppe und das Vorhandensein von Markerchromosomen, die offenbar durch Fusion von D- und G-Chromosomen entstanden sind (Alexander et al. 1976). Wie verschiedene Autoren zeigen konnten, enthält die DNA von PLC/PRF/5 mehrere integrierte HBV-Kopien (Brecht et al. 1980, Edman et al. 1980, Gray et al. 1980). Die Zelllinie exprimiert HBsAg und sekretiert 22 nm große Partikel, welche dieses Protein enthalten (Marion et al. 1979). Sie produziert aber keine Dane-Partikel (Macnab et al. 1976). Allerdings konnten sogenannte beta-Partikel (Hofschneider et al. 1980, Marquardt et al. 1982) gefunden werden, die vielleicht defektive Virionen darstellen. In immundefizienten Mäusen wachsen PLC/PRF/5-Zellen zu Tumoren heran und können auch Metastasen bilden (Sattler et al. 1982).

PROBLEMSTELLUNG

Zu Untersuchungen der molekularen Wirkungen von integrierter HBV-DNA ist die Analyse solcher Sequenzen notwendig. Deshalb wurden, ausgehend von der DNA der PLC/PRF/5-Zelllinie, Fragmente mit integrierter HBV-DNA kloniert und charakterisiert. Diese Studien sollen die Beantwortung der folgenden Fragen ermöglichen:

- Welche Struktur und Funktion hat die virale DNA im integrierten Zustand?
- Gibt es bestimmte Integrationsstellen auf viraler und humaner Ebene?
- Spielen bei der Integration die möglichen terminalen Duplikationen des HBV-Genoms eine Rolle? Oder läßt sich ein anderer Mechanismus bei der Integration erkennen?
- Welche Effekte übt die Integration des viralen Genoms auf die humane DNA aus?
- Welche Funktionen haben die flankierenden, humanen DNA-Sequenzen?
- Haben diese Sequenzen im Zusammenwirken mit der integrierten viralen DNA onkogenes Potential?
- Stehen die gewonnenen Daten mit bekannten Mechanismen der Tumorgenese im Einklang?

Da im Genom der PLC/PRF/5-Zelllinie mindestens sechs humane DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA vorkommen, wurde die sehr aufwendige Charakterisierung dieser Fragmente zum Teil von Arndt Freytag von Loringhoven in einer parallel durchgeführten Dissertation angegangen. Werden Daten aus seiner Arbeit erwähnt, sind diese immer durch das Zitieren seiner Dissertation gekennzeichnet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva
Agarose	Seakem
alpha-(³² P)-dCTP	Amersham
Aminopterin	Serva
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bisacrylamid	Serva
Borsäure	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	BRL, Sigma
Caesium Chlorid	Baker Chemicals
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Eastman, Kodak
Chloramphenicol	Sigma
DMS (Dimethylsulfat)	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
DTT (Dithiothreitol)	Merck
Deoxyribonukleosidtriphosphate	Boehringer
EDTA (Ethyldiamintetraazetat)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid, ultra pure	BRL
gamma-(³² P)-ATP	Amersham
Glyoxal	Ega Chemie
Guanidin-Hydrochlorid	Serva
Guanidin-Isothiocyanat	Fluka
Harnstoff	Biorad
Hefeextrakt	Difco
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-2-Piperazinethansulfonsäure)	Sigma
Hydrazin 99%, wasserfrei	Carl Roth
Hypoxanthin	Serva
Kanamycin-Sulfat	Serva

2-Merkaptoethanol	Merck
Na-Cacodylat	Serva
PEG 6000 (Polyethylenglycol 6000)	Serva
Phenol (destilliert)	Merck
Piperidin 99%	Sigma
Putrescin	Serva
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Repelcote	Hopkin & Williams
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Silan GF31	Wacker Chemie
Spermidin	Serva
Szintillationsreagens (Quickszint 501)	Zinsser
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma
TCA (Trichloressigsäure)	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin)	Serva
Thymidin	Serva
Tris, Trizma (Tris-hydroxymethyl- aminomethan)	Merck, Sigma
Triton X-100	Serva

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck bezogen.

2.1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme

Acc I	Biolabs
Bam HI	Boehringer
Bgl II	Boehringer
Eco RI	BRL
Hae III	Boehringer
Hind III	Boehringer
Nco I	Biolabs
Pst I	BRL
Tth I	Biolabs

Xho I

BRL

Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase

Boehringer

DNA Polymerase I (E. coli)

New England Nuclear

DNase I (E. coli)

Boehringer

Lysozym

Boehringer

Polynukleotidkinase

Boehringer

Proteinase K

Merck

Trypsin

Seromed

T4-Ligase

New England Nuclear

2.1.3. Kleinmaterial

DE81-Papier

Whatman

Dialysesschläuche Nr. 8

Wiskin

Filterpapier Nr. 1

Whatman

Nitrozellulosefilter

Millipore

(Porengröße 0,45 µm)

Röntgenfilm XAR 5

Kodak

Teflonfolie 0,2 mm

Thyssen & Schulte

Verstärkerfolie (Lightning Plus,

Dupont

Xtra Life, Cronex)

2.1.4. DNA

Bakteriophage lambda

762 Murray et al. 1977
 cI 90 Renner GmbH
 als Längenstandard verwendet,
 ergibt nach Inkubation mit Hind III folgende
 Fragmente (kb): 22,5; 9,1; 6,3; 4,15; 2,17; 1,9; 0,53

Plasmide

pBR327 Soberon et al. 1980
 auch als Längenstandard verwendet, ergibt
 nach Inkubation mit Hae III folgende Fragmente (bp):
 587,458,434,267,234,213,192,168,124,123,104,89,80,64

pAO1-HBV Cummings et al. 1980
 H-1 (Ha-ras) Ellis et al. 1980
 pSRA-2 (src) DeLorbe et al. 1980
 pAE-11 (erb) Vennström et al. 1980
 pFeSV (fes) Sherr et al. 1980
 pHax-4 (myb) Perbal & Baluda 1982
 pK-ras (Ki-ras) McCoy et al. 1983
 pHB-11 (Ha-ras) Ellis et al. 1981
 pABL-Sub9 (abl) Wang & Baltimore 1983
 pC14 (sis) Gelmann et al. 1982
 pMCO (myc) Dalla Favera et al. 1982
 pCMYC (c-myc) Battey et al. 1983
 pfms (fms) Donner et al. 1980
 pYes (yes) Kitamura et al. 1982

Sonstige

DNA aus Lachssperma Serva
 DNA aus Kalbsthymus Serva

2.1.5. E. coli Bakterienstämme

490A	hsd _R , hsd _M , recA, gal, lac, pro, leu, rpsL (Dr. B. Hobom)
C600	trp, thy, leu, his, recA (Appleyard et al., 1954)
BHB 2688	N205 recA (imm ₄₃₄ , cI _{ts} , b2, red3, E _{am} ¹⁵ , S _{am} ⁷)/lambda (Hohn 1979)
BHB 2690	N205 recA (imm ₄₃₄ , cI _{ts} , b2, red3, D _{am} ¹⁵ , S _{am} ⁷)/lambda (Hohn 1979)

2.1.6. Zelllinien

PLC/PRF/5	primäres, humanes hepatozelluläres Karzinom	Alexander et al. 1976
NIH3T3	Mausfibroblast	Aaronson & Todaro 1968
Ltk	Mausfibroblast	Kit et al. 1963

2.2. Methoden

2.2.1. Arbeiten mit DNA

2.2.1.1. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

11 LB-Medium (2.2.2.1.) mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin 30 ug/ml; Tetracyclin 100 ug/ml) wird mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur von plasmidhaltigen Bakterien angeimpft und bei 37°C bis O.D.₆₅₀=0,8 wachsen gelassen. Nach Zugabe von Chloramphenicol (200 ug/ml) wird weitere 24-40 h geschüttelt. Die Bakterien werden abzentrifugiert (5.000 rpm, GSA Rotor, 10 min, 4°C); in 150 ml TES-Puffer (50 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 10 ml einer eiskalten Sucrose-Lösung (25% Sucrose, 50 mM Tris pH 8,0) resuspendiert und 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Lyse der Zellen erfolgt bei 4°C: Zunächst werden 2 ml einer frischen LysozymbLösung (5 mg Lysozym/ml in 250 mM Tris pH 8,0) zugegeben. Nach 10 min werden 4 ml einer EDTA-Lösung (250 mM Tris pH 8,0) und nach weiteren 10 min 16 ml einer Triton X-100 Lösung (in 50 mM Tris pH 8,0; 60 mM EDTA) zugegeben. 20 min später werden die aufgebrochenen Bakterien abzentrifugiert. Zum Überstand (dem klaren Lysat) werden 0,9 g/l CsCl und 500 ug/ml Ethidiumbromid gegeben. Der Brechungsindex wird mit CsCl auf 1,395 eingestellt. Nun wird 30 min bei 16.000 rpm in einem SS34 Rotor bei 10°C zentrifugiert, wodurch sich der Großteil der Proteine am oberen Rand des Röhrchens befindet. Nach Entfernung dieser Proteinschicht wird durch Dichtegradientenzentrifugation (Ti50 Rotor, 48 h, 45.000 rpm, 15°C) die DNA in zwei Banden aufgetrennt. Die untere Bande, die Plasmid-DNA der "supercoiled" Form enthält, läßt sich nun durch seitliches Einstechen mit einer Kanüle abnehmen und wird nochmal in einem Dichtegradienten zentrifugiert (SW 41, 48 h, 40.000 rpm, 15°C). Durch die zweimalige Zentrifugation wird RNA abgetrennt, die besonders bei der DNA-Sequenzierung stören würde. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wird

dreimal mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Dann wird über Nacht unter mehrfachem Pufferwechsel gegen TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) dialysiert (die Dialyseschläuche waren 10 min in 0,5% SDS und 10 min in 10 mM EDTA gekocht worden), zweimal mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer gelöst. Um die DNA-Konzentration und Verunreinigungen mit Proteinen zu bestimmen, wird die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei reiner DNA ist das Verhältnis von $O.D._{260} : O.D._{280} = 2 : 1$. Das Verhältnis von $O.D._{260} : O.D._{235}$ sollte größer sein als das von $O.D._{260} : O.D._{280}$. 1 $O.D._{260}$ entspricht 50 µg/ml.

2.2.1.2. Schnellpräparation von Plasmid-DNA (Birnboim & Doly 1979)

Bakterien werden in 5-20 ml Kulturen für mindestens 12 h bei 37°C geschüttelt und dann im Eisbad abgekühlt. Von jeder Kultur wird 1 ml in Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und abzentrifugiert (Eppendorffzentrifuge; 2 min). Die sedimentierten Bakterien werden bei 4°C in 100 µl einer frisch hergestellten LysozymbLösung (2 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8) resuspendiert und 30 min stehen gelassen. Es werden 200 µl alkalische SDS-Lösung (1% SDS; 0,2 M NaOH) und nach 5 min 170 µl 3 M Na-Azetat (pH 4,8) zupipettiert und stark geschüttelt. Nach einer Stunde wird die Suspension zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 5 min). Der Überstand (400 µl) wird zweimal mit Ethanol gefällt und in 40 µl TE-Puffer (2.2.1.1.) gelöst. 10 µl reichen für eine gelelektrophoretische Analyse aus.

2.2.1.3. Isolierung von lambda-DNA

1 ml einer frischen E. coli Übernachtskultur (rund 2×10^9 Zellen/ml) und 1 ml Phagen (10^6 - 10^7 pfu) werden gemischt und für 10 min bei 37°C stehen gelassen. Diese Mischung wird zu 200 ml LB-Medium, das zusätzlich 10 mM MgSO_4 enthält, gegeben und bei 37°C unter starkem Schütteln wachsen gelassen. Nach 7-15 h sind die Bakterien lysiert. Zu je 200 ml eines solchen Lysats wird 8 g NaCl und einige Tropfen Chloroform gegeben, 10 min bei 37°C geschüttelt und abzentrifugiert (10.000 rpm, GSA Rotor Sorvall, 10 min). Ein Aliquot des klaren Überstands wird zur Titerbestimmung (2.2.2.3.) abgenommen. Nur hochtitrige Lysate (1×10^9 pfu/ml) werden für die DNA-Isolierung verwendet (2×10^{10} pfu ergeben 1 μg lambda-DNA). Im Überstand werden 20 g PEG 6000 durch Schütteln gelöst und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (10.000 rpm, GSA Rotor Sorvall, 10 min) und das Sediment in 8 ml Phagenpuffer (auf 1 l: 3 g KH_2PO_4 , 7 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 10 ml 0,1 M MgSO_4 , 10 ml 0,01 M CaCl_2) über Nacht bei 4°C gelöst. Die Lösung wird für 2 h bei 37°C mit RNase und DNase (je 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Dann wird das PEG 6000 mit Chloroform ausgeschüttelt, die wässrige Phase abgenommen und zentrifugiert (27.000 rpm, 2 h, 10°C , SW 27). Das Sediment von 1 l Ausgangslysat wird in 10 ml Phagenpuffer gelöst (4°C , über Nacht), über einen Stufengradienten (1,5 ml 1,65 g/ml CsCl, 1 ml 1,45 g/ml CsCl; CsCl in Phagenpuffer gelöst) geschichtet und zentrifugiert (34.000 rpm, 15°C , 26 h, SW 41). Die Phagenbande, die bei 1,5 g/ml CsCl liegt, wird mit einer Kanüle seitlich abgenommen. Diese Lösung wird mit gesättigtem CsCl (in Phagenpuffer) gemischt, in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, wieder mit einem Stufengradienten von 1,65 und 1,45 g/ml CsCl überschichtet und nochmals zentrifugiert (34.000 rpm, 15°C , 26 h, SW 41). Die abgenommene Phagenbande wird 1 h gegen Phagenpuffer dialysiert. Dann wird SDS bis 1% Konzentration zugegeben und dreimal mit TE-gesättigtem Phenol (TE=10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) vorsichtig extrahiert. Anschließend wird die DNA

wie unter 2.2.1.1. dialysiert, mit Ethanol gefällt und in TE aufgenommen.

2.2.1.4. Isolierung chromosomaler DNA

(Perucho et al. 1981)

Zellrasen (Zellkultur: Kapitel 2.2.5.) von rund 10^7 Zellen werden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und für 5 min bei 200g zentrifugiert (2.2.5.). Das Zellsediment wird in 5 Volumenteilen 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5) aufgenommen, zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml Proteinase K und 0,4% SDS gebracht, 20 min bei 65°C und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe einer gleichen Menge 650 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0) wird die Lösung dreimal mit einem gleichem Volumen von TE-gesättigtem Phenol (2.2.1.3.), einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1) und zweimal mit Chloroform/ Isoamylalkohol (25:1) ausgeschüttelt. Die Phasen werden jeweils durch Zentrifugieren (5.000 rpm, SS34 Rotor, 5 min) getrennt. Nun wird der wässrige Überstand auf 0,3 M Na-Azetat eingestellt und die DNA mit zweieinhalb Volumen Ethanol gefällt. Nach Inkubieren bei -20°C für einige Minuten wird das DNA-Knäuel entnommen, kurz getrocknet und in TE-Puffer gelöst (rund 1 mg/ml DNA). Nach einer weiteren Ethanolfällung und Lösen in TE-Puffer wird die DNA bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

2.2.1.5. Restriktion

In einem typischen Ansatz werden zu 0,5-1 µg DNA, 2 µl 10x Restriktionspuffer (siehe unten), 2 µl BSA-Lösung (100 mg/l) und die für eine vollständige Spaltung notwendige Menge an Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl gegeben. Die Inkubation erfolgt für 1-2 h je nach Enzym bei 30°C, 37°C oder 65°C. Zelluläre DNA wird in der Regel mit 2-3 Enzymeinheiten/µg DNA 2-3 h lang verdaut.

Restriktionspuffer

<u>Enzym</u>	<u>1x Puffer</u>
Acc I	10 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
Bam HI, Bgl II, Hind III, Tth I	50 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
Eco RI, Hae III	100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
Nco I, Pst I, Xho I	50 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8; 10 mM MgCl ₂

2.2.1.6. Agarosegel-Elektrophorese

Mittels Elektrophorese durch 0,3-2% Agarosegele können DNA Fragmente von 0,1-50 kb gut aufgetrennt werden (Maniatis et al., 1982). Analytische Gele werden auf folgende Weise hergestellt: Die Agarose wird in E-Puffer (50 mM Trizma, 1 mM EDTA, 5 mM Na-Azetat, pH 7,9) durch Kochen gelöst und auf 65°C abgekühlt, wobei Ethidiumbromid einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt wird. Nach dem Gießen wird das Gel für mindestens 2 h stehen gelassen. Die Elektrophorese in E-Puffer dauert bei 25 V/45 mA 15 h oder bei 50 V/90 mA 5 h. Für die Elektrophorese 0,8-1%iger Gele werden horizontale, für die 1,4-2%igen Gele vertikale Apparaturen verwendet.

Vor dem Auftragen wird die DNA-Lösung mit 0,1 Volumenteilen Sucrose-Farblösung (10xLösung: 50% Sucrose; 10 mM EDTA; 3 M Harnstoff; 0,1% Xylencyanol; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Orange G) gemischt. In der Regel werden 0,5-1 µg Plasmid- oder Phagen-DNA bzw. 10-20 µg zellulärer DNA aufgetragen. Die aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids bei kurzweiligem UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden werden durch einen Rotfilter photographiert.

2.2.1.7. Elektroelution von DNA-Fragmenten

Nach präparativer Agarosegel-Elektrophorese werden die DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Agarosestücke in einen Dialyseschlauch überführt. Nach Zugabe eines möglichst geringen Volumens von E-Puffer (2.2.1.6.) wird der Dialyseschlauch in eine Elektrophoresekammer eingelegt und die DNA durch weitere Elektrophorese aus dem Gel eluiert. Um Agarosereste abzutrennen, die bei späteren enzymatischen Reaktionen stören würden, wird die DNA-Lösung mit TE-gesättigtem Phenol (2.2.1.3.) ausgeschüttelt (2 min stark schütteln), anschließend in einem Ethanol-Trockeneis-Bad (-80°C) eingeforen und sofort für 3 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Das am Boden befindliche, kristalline Phenol enthält Agarosereste. Der Überstand wird erneut auf gleiche Weise behandelt, zweimal mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer (2.2.1.1.) aufgenommen.

2.2.1.8. Southern Analyse

(Southern 1975)

Bei dieser Analyse wird DNA aus einem Agarosegel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen. Die Bandenpositionen der mit Ethidiumbromid gefärbten Längenstandard DNA werden unter UV-Licht durch Einstiche mit einer Pasteurpipette markiert. Das Gel wird für 2x15 min mit 0,25 M HCl, für 30 min mit 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl, für 45 min mit 0,5 M Tris (pH 7,4) / 1,5 M NaCl und für 10 min mit 20xSSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat) inkubiert. Auf vier Lagen mit 20xSSC angefeuchtetem Whatman-Papier, dessen Enden in einen Behälter mit 20xSSC reichen, wird das Gel, darauf der mit H_2O und anschließend mit 20xSSC getränkte Nitrozellulosefilter, darauf zwei Lagen mit 20xSSC getränktem Whatman-Papier und darauf ein Stapel trockener Papierhandtücher gelegt, welche die Flüssigkeit und mit ihr die DNA nach oben, und damit auf den Filter, saugen. Die Papierhandtücher werden innerhalb von 20 h 4-5 mal gegen

trockene ausgewechselt. Beim Auflegen des Filters und der zwei feuchten Whatman-Papiere ist es wichtig, eventuell vorhandene Luftblasen und ein Zuviel an Flüssigkeit durch vorsichtiges Rollen mit einer Pasteurpipette zu entfernen. Nach den 20 h werden das Gel und der an ihm klebende Filter zusammen entnommen und umgekehrt (mit dem Gel nach oben) auf eine Glasplatte gelegt. Die mit der Pasteurpipette markierten Positionen auf dem Gel können nun mit einer Nadel auf den Filter übertragen werden. Anschließend wird der Filter vom Gel abgenommen, für 30 min an der Luft getrocknet und dann für 3 h im Vakuum bei 80°C gebacken.

Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA werden die Filter mit der gebundenen DNA in Plastiktüten eingeschweißt und bei 68°C in 5xSSC, 0,02% BSA, 0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,05% SDS, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA (Denhardt 1966) 1 h vorhybridisiert. Zusätzlich erhält die Lösung 250 µg/ml Lachssperma-DNA, die durch Ultraschallbehandlung auf eine durchschnittliche Länge von etwa 300 bp reduziert und 5 min lang gekocht worden war. Nach einer Stunde wird die Lösung durch die gleiche Lösung ersetzt, die zusätzlich 2×10^6 cpm/ml hitzedenaturierte (für 5 min gekocht), nicktranslatierte (2.2.1.9.) DNA enthält. Nach Hybridisierung für 24-36 h werden die Filter 1 h in 2xSSC, 0,5% SDS bei 65°C und dann 30 min in 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Sie werden getrocknet und zwischen 30 min (klonierte DNA) und 1-7 Tagen (genomische DNA) bei -80°C exponiert. Dabei wird Röntgenfilm und Verstärkerfolie verwendet.

Statt der Hybridisierungslösung von Denhardt und der Lachssperm-DNA kann auch eine Sarkosyllösung (5xSSC; 1% Sarkosyl) verwendet werden. Gewaschen wird in diesem Fall mit 2xSSC / 0,5% Sarkosyl bzw. mit 0,1xSSC / 0,1% Sarkosyl (Overbeek et al. 1981).

2.2.1.9. Nicktranslation

(Rigby et al. 1977)

Bei der Nicktranslation wird doppelsträngige DNA radioaktiv markiert. Dabei werden hohe spezifische Aktivitäten erreicht. Ein Standardansatz enthält in 25 μ l:

DNA	0,004 μ g/ μ l
Tris pH 7,5	50 mM
MgSO ₄	10 mM
DTT	1 mM
dATP	40 μ M
dGTP	40 μ M
dTTP	40 μ M
alpha-(³² P)-dCTP	2 μ M (100 uCi) (3000 Ci/mmol)
DNase I	1x10 ⁻⁵ μ g/ μ l
DNA Polymerase I	0,5 U/ μ l

Die Inkubation erfolgt für 1-1,5 h bei 15°C. Die markierte DNA wird durch eine CTAB- und eine Ethanolfällung von nichteingebauten Nukleotiden gereinigt. Der Nicktranslationsansatz wird dazu auf 100 μ l gebracht. Die DNA wird nach Zugabe von 20 μ l Lachssperma-DNA (5 mg/ml) mit 20 μ l 0,1 M CTAB in 1 h bei 0°C gefällt (Bellamy & Ralph 1968). Die abzentrifugierte DNA (10 min, Eppendorffzentrifuge) wird in 100 μ l 1 M NaCl resuspendiert, nochmals mit Ethanol gefällt und in TE-Puffer (2.2.1.1.) aufgenommen.

Um die spezifische Aktivität der ³²P-markierten DNA zu bestimmen, wird 1 μ l des Ansatzes mit 200 μ l "TCA-Stop-Lösung" (1xSSC, 1% Na₄P₂O₇, 0,1 mg/ml BSA) auf Eis gemischt, 5 μ l einer ultraschallbehandelten Lachssperma-DNA (5 mg/ml) und 20 μ l eiskalter 60% TCA Lösung zugegeben. Die so gefällte DNA wird dann über Nitrozellulose filtriert, wobei mehrmals mit 6% TCA gespült wird. Nichteingebaute Nukleotide werden dabei abgetrennt. Der Filter wird getrocknet und die

an ihn gebundene Aktivität nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit in einem Packard 3380 Beta Zähler bestimmt. Eine spezifische Aktivität von 2×10^8 cpm/ug DNA wird routinemäßig erreicht.

2.2.1.10. DNA-Sequenzierung

(Maxam & Gilbert 1980)

Die DNA-Sequenzierungstechnik nach Maxam und Gilbert ermöglicht die Bestimmung der Basenreihenfolge einer DNA-Sequenz, ausgehend von einer bestimmten Restriktionsstelle. Die betreffende Endonuklease schneidet die DNA an der Stelle, von wo aus sequenziert werden soll. Dann markiert Polynukleotidkinase (PNK) die Restriktionsfragmente an beiden Enden radioaktiv. Eine zweite Endonuklease (Nachschnitt) schneidet die DNA so, daß das gewünschte Fragment nur noch an einem Ende markiert ist. Dieses Fragment wird über ein präparatives Agarosegel (2.2.1.7.) abgetrennt und für die basenspezifischen Reaktionen eingesetzt. Hierbei werden spezifisch, aber nur partiell, jeweils eine oder zwei bestimmte Basen modifiziert und die DNA anschließend an dieser Stelle gespalten: An Guanin allein (G), an Guanin und Adenin (G+A), an Cytosin allein (C) und an Cytosin und Thyminidin (C+T). Die vier Ansätze werden nebeneinander auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Auf einem Röntgenfilm, der mit dem radioaktiven Gel exponiert wurde, ist die Sequenz, beginnend mit den kleinsten Bruchstücken, ablesbar: Ein Signal in der A+G-Spur bedeutet Adenosin, wenn auf gleicher Höhe kein Signal in der G-Spur vorhanden ist. Ist das jedoch der Fall, liest man Guanin. Analog steht für eine Bande in der C+T-Spur Cytosin und für korrespondierende Banden in T- und C+T-Spur Thyminidin.

2.2.1.10.1. Dephosphorelierung

Um am 5'-Ende radioaktives Phosphat einzubauen, muß alkalische Phosphatase (calf alkaline phosphatase: CAP) vorher von der DNA die unmarkierte Phosphat-Gruppe abspalten. Zur Sequenzierung wird 1 µg DNA pro 1 kb Plasmid-DNA eingesetzt. Die DNA wird in 10 mM Tris (pH 8,5) / 10 mM NaCl für 30 min bei 60°C mit 0,005 U/µl CAP inkubiert. Anschließend zerstört gesättigtes Phenol das Enzym durch dreimaliges Ausschütteln: Nach Zugabe von Phenol wird das Reaktionsgefäß jeweils zwei Minuten stark gemischt (Vortexer), dann für zwei Minuten zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der dritten Phenolisierung wird die DNA zweimal mit Ethanol gefällt und getrocknet.

2.2.1.10.2 Endmarkierung

Die Polynukleotidkinase (PNK) baut eine Phosphatgruppe, die sie von ATP abspaltet, an ein unphosphoreliertes 5'-Ende der DNA. Das für die Reaktion verwendete ATP trägt deshalb in gamma-Stellung ^{32}P -Phosphat. PNK kann nur an 5'-Enden, sowohl an überstehende als auch - allerdings weniger gut - an glatten Enden, arbeiten. Ein 50 µl-Ansatz enthält neben der dephosphorelierten DNA 70 mM Tris (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 5 uCi/µl gamma- (^{32}P) -ATP (3000 Ci/mmol) und 0,4 U/µl PNK. Der Ansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und kann dann direkt aufs Gel gegeben werden, außer der Nachschnitt erfolgt sofort nach der Endmarkierung. In diesem Fall wird einmal phenolisiert, zweimal mit Ethanol gefällt, das Pellet getrocknet und in Wasser resuspendiert.

2.2.1.10.3. Basenspezifische Reaktionen

Das gewünschte Fragment wird nach der Elution aus einem präparativen Gel (2.2.1.7.) in 26 µl Wasser gelöst und für

die vier Modifikationsreaktionen G (5 ul), C (5 ul), C+T (7,5 ul) und G+A (7,5 ul) eingesetzt. Der Strangbruch mit Piperidin ist für alle vier Reaktionen gleich (2.2.1.10.4.). Anschließend kommt je 1 ul der vier Ansätze auf das Sequenzierungsgel.

G+A-Reaktion

Ansatz

11,5 ul Wasser

1 ul Kalbsthymus-DNA; 1 mg/ml, geschert und phenolisiert
7,5 ul ^{32}P -DNA

2 ul Piperidin-Formiat (40% Ameisensäure, mit Piperidin
auf pH 2 eingestellt)

Die ersten drei Komponenten werden zusammen pipettiert, kurz gemischt, kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe des Piperidin-Formiats wird kurz gemischt, kurz zentrifugiert und 50 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Ansatz eingefroren und eine Stunde lyophilisiert. Bei -20°C kann das Pellet bis zum Strangbruch aufbewahrt werden.

G-Reaktion

Ansatz

200 ul DMS-Puffer (50 mM Na-Cacodylat pH 8,0; 1mM EDTA)

1 ul Kalbsthymus-DNA; 1 mg/ml, geschert und phenolisiert
5 ul ^{32}P -DNA

1 ul Dimethylsulfat (DMS)

Die ersten drei Komponenten werden zusammen pipettiert, kurz gemischt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe des DMS wird kurz gemischt, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Genau 2 Minuten nach dem Start der Zentrifuge wird der Ansatz auf Eis gestellt und die Reaktion sofort mit 50 ul DMS-Stop (1,5 M Na-Azetat pH 7,0; 1 M Mercaptoethanol; 100 ug/ml phenolisierte tRNA)

abgebrochen. Dann wird ohne weitere Zugabe von Na-Azetat einmal mit Ethanol gefällt. Das Pellet wird in 250 μ l 0,3 M Na-Azetat gelöst und dann ohne weitere Zugabe von Na-Azetat zweimal mit Ethanol gefällt. Das im Vakuum getrocknete Pellet wird bis zum Strangbruch bei -20°C aufbewahrt. Der Überstand wie auch die mit DMS kontaminierten Pipettenspitzen kommen in eine Flasche mit 5 M NaOH, um das giftige DMS unschädlich zu machen.

C und C+T-Reaktion

Ansatz für C-Reaktion

4 μ l Wasser
 10 μ l 5 M NaCl
 1 μ l Kalbsthymus-DNA; 1 mg/ml; geschert und phenolisiert
 5 μ l ^{32}P -DNA
 30 μ l Hydrazin

Ansatz für C+T-Reaktion

11,5 μ l Wasser
 1 μ l Kalbsthymus-DNA; 1 mg/ml, geschert und phenolisiert
 7,5 μ l ^{32}P -DNA
 30 μ l Hydrazin

Die Ansätze werden bis auf Hydrazin zusammen pipettiert, kurz gemischt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von Hydrazin wird kurz gemischt, kurz zentrifugiert und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Genau 2 Minuten nach dem Start der Zentrifuge werden die Ansätze auf Eis gestellt und die Reaktion sofort mit 200 μ l HZ-Stop (0,3 M Na-Azetat; 0,1 M EDTA; 25 μ g/ml phenolisierte tRNA) abgebrochen. Dann wird ohne Zugabe von Na-Azetat einmal mit Etanol gefällt und abzentrifugiert. Nach diesem Schritt bildet sich manchmal eine Hydrazinblase, die die DNA enthält, am Boden des Reaktionsgefäßes. Die obere Phase wird dann vorsichtig abgenommen; die Blase in 50 bis 100 μ l Wasser gelöst und einmal mit Ethanol gefällt. Dieser Vorgang

muß solange wiederholt werden, bis die Blase verschwunden ist. Das Pellet wird in 250 µl 0,3 M Na-Azetat gelöst und dann ohne weitere Na-Azetat-Zugabe zweimal mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wird bis zum Strangbruch bei -20°C aufbewahrt. Alle Überstände wie auch die mit Hydrazin kontaminierten Pipettenspitzen kommen in eine Flasche mit 2 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, um das giftige und explosive Hydrazin unschädlich zu machen.

2.2.1.10.4. Strangbruch

Piperidin wird frisch im Verhältnis 1:10 mit eiskaltem Wasser verdünnt. Jeweils 100 µl des nun 1 M Piperidins lösen die getrockneten DNA-Pellets, die nach (2.2.1.10.3.) erhalten wurden. Die Reaktionsgefäße werden stark gemischt (Vortexer), kurz zentrifugiert und dann bei 90°C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße im Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und für 1 h lyophilisiert. Zweimal werden die Ansätze noch in jeweils 20 µl Wasser gelöst und für je 30 min lyophilisiert. Nach Zugabe von 5 bis 10 µl FLD (80% Formamid, ultra pure; 10 mM NaOH; 1 mM EDTA; 0,1% Xylencyanol; 0,1% Bromphenolblau) sind die Proben fertig für die Sequenzierungsgele.

2.2.1.10.5. Sequenzierungsgele

Die Herstellung der nur 0,2 mm dicken Polyacrylamidgele erfolgt nach der "Schiebe-Technik" (Garoff & Ansorge 1981). Diese dünnen Gele werden auf einer Glasplatte fixiert, um eine verzerrungsfreie Autoradiographie von ihnen zu erhalten. Die absolut planen Glasscheiben (20 x 40 cm), zwischen denen das Gel polymerisiert, müssen deshalb besonders behandelt sein. Die Platte, auf der das Gel kleben soll, wird silanisiert, die andere wird silikonisiert, damit sie sich vom Gel löst. Um die beschichteten Seiten später nicht zu verwechseln, sind sie mit einer Gravur gekennzeichnet.

net. Die Glasplatten müssen vor jeder Benutzung erneut beschichtet werden.

Jeweils vier Reaktionen eines Fragments werden in der Reihenfolge G, G+A, C+T, C aufgetragen und bei 2000 V (8%ige und 6%ige Gele) bzw. bei 3000 V (20%iges Gel) aufgetrennt. Verschiedene Gelsorten und unterschiedlich lange Laufzeiten ergeben überlappende Sequenzen und ermöglichen es so, mehr als 300 Basen lesen zu können. Bei der Auftrennung dienen die Farbstoffe Bromphenolblau (BPB) und Xylencyanol (XC) als Marker. Das Gel wird gestoppt, wenn der betreffende Marker teilweise, ganz, oder -rechnerisch- zweimal oder dreimal das Gel durchlaufen hat. Der lesbare Bereich auf den verschiedenen Gelen ist in folgender Tabelle angegeben.

Gel	Laufstrecke des Markers	lesbare Basen
20%	1/3 BPB	< 25
8%	1x BPB	20 - 100
8%	1x XC	60 - 160
6%	2x XC	140 - 200
6%	3x XC	180 - 300

Nach der entsprechenden Laufzeit werden die Glasplatten vorsichtig mit einem Blech, das zwischen sie geschoben wird, getrennt. Das auf der Glasplatte klebende Gel wird bei 20%igen Gelen sofort mit dünner Plastikfolie überzogen und mit einem Röntgenfilm bei -70°C exponiert. Alle anderen Gele werden für 15 min in 10% Essigsäure fixiert. Bei der Essigsäurefixierung wird der Harnstoff ausgewaschen, der später beim Trocknen stören würde. Anschließendes Spülen unter fließendem Wasser entfernt die Essigsäure. Mit fusselfreien Papiertüchern werden die Gele abgetrocknet, bei 60°C für mindestens 2 h völlig getrocknet und nach Auflegen eines Röntgenfilms bei -70°C exponiert. Die Exposition erfolgt in lichtdichten Kassetten, die auf der dem Film zugewandten Seite eine strahlenverstärkende Folie tragen. Die Dauer der Exposition, einige Tage bis Wochen, richtet

sich nach der Güte der Endmarkierung und der Menge der eingesetzten DNA. Die getrocknete Gelschicht kann nach Einlegen in 10% Essigsäure für einige Tage wieder von der Glasplatte gelöst werden.

Silanisierung

Für eine 20 X 40 cm große Glasplatte, auf der das Gel kleben soll, wird eine Mischung von 5 ml 100% Ethanol, 150 μ l 10% Essigsäure und 15 μ l Silan GF31 (Wacker Chemie) auf der Platte mit einem Papiertuch verteilt. Nach einigen Minuten wird die Platte mit 100% Ethanol gespült, mit Papiertüchern getrocknet und intensiv poliert.

Silikonisierung

Auf der Glasplatte, die sich vom Gel lösen soll, werden 3 bis 4 ml Repelcote (Hopkin & Williams) verteilt. Nach einigen Minuten wird die Platte mit 100% Ethanol gespült und mit Papiertüchern getrocknet und intensiv poliert.

Polyacrylamidgele

Die Mischung der Gellösungen richtet sich nach folgender Tabelle:

	20%	8%	6%
Harnstoff	31,5 g	31,5 g	31,5 g
Acrylamid	14,5 g	15 ml (40%)	11 ml (40%)
Bisacrylamid	0,75 g	15 ml (2%)	11 ml (2%)
1 M TBE	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Wasser	ad 75 ml	ad 75 ml	ad 75 ml

Die Lösung wird durch zwei Lagen Filterpapier Whatman Nr. 1 in eine Saugflasche filtriert. Für ein Gel werden 50 ml

dieser Lösungen mit 0,5 ml frisch hergestelltem 10% Ammoniumpersulfat und 30 μ l TEMED gemischt. Die Polymerisierung sollte bei diesen Konzentrationen nach 5-10 min abgeschlossen sein. Nach 30 Minuten können die Platten in die Elektrophoreseapparatur eingespannt werden. Die Kammern werden mit 0,1 M TBE-Puffer (1 M TBE: 1M Tris, pH=8,3; 1 M Borsäure; 10 mM EDTA) gefüllt, der Teflonkamm herausgezogen und die Geltaschen sofort mit Hilfe einer Spritze ausgespült. Die Geltaschen nehmen jeweils 1 μ l der Proben auf, die mit einer entsprechend dünn ausgezogenen 50 μ l Glaskapillare aufgetragen werden.

2.2.1.11. Computerprogramme

Analysen (Restriktionskarten, Suche nach Expressionssignalen, Translation in Aminosäuresequenzen) und Vergleiche der DNA-Sequenzen können mit einem VAX 11/782 Computer von Digital Equipment Corporation mit Hilfe der FORTRAN-77-Programme NAQ, RELATE, ALIGN und SEARCH (Dayhoff et al. 1981) durchgeführt werden.

2.2.2. Arbeiten mit Bakterien und Phagen

2.2.2.1. Medien

LB-Medium (auf 1 l)	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
LB-Platten	LB-Medium 1,5% Difco Agar
LB-Weichagar	LB-Medium 0,7% Difco Agar
LB-Weichagarose	LB-Medium 0,7% Seakem Agarose

Für die Vermehrung von lambda-Phagen enthalten alle Medien 10 mM MgSO_4 .

VFM (auf 1 l)	1 g Bacto-Trypton 10 g NaCl 2,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
---------------	---

2.2.2.2. Übernachtskultur

5 ml des gewünschten Mediums werden mit 0,05 ml einer stationären Bakterienkultur angeimpft und auf einem Schüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kultur hat dann rund 2×10^9 Zellen/ml.

2.2.2.3. Bestimmung von Phagentitern

Zu 0,2 ml einer frischen Übernachtskultur werden 0,1 ml einer Pagenverdünnung (in VFM) gegeben und 10 min bei 37°C stehen gelassen. Diese Mischung wird in 3 ml LB-Weichagar (mit 10 mM MgSO_4) gegeben und gleichmäßig auf eine LB-Platte (mit 10 mM MgSO_4) verteilt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden die Plaques ausgezählt und nach Berücksichtigung der Verdünnung der Titer (pfu/ml) berechnet.

2.2.2.4. Test auf MMS-Sensitivität

3 ml LB-Weichagar werden mit 10 μl Methan-methyl-sulfonat (MMS) auf eine LB-Platte gegossen und etwa 1 h stehengelassen, damit das MMS in den Agar diffundieren kann. Danach können die zu testenden Bakterienstämme aufgetropft werden. MMS-sensible Stämme (z.B. *polA*- und *recA*-Mutanten) werden völlig abgetötet, *polA*⁺- oder *recA*⁺-Stämme sind MMS-resistent.

2.2.2.5. Glyzerinkultur

Bakterien und Phagen können in Glyzerinlösung eingefroren werden und sind so jahrelang haltbar. Dazu wird 200 μl 95% Glyzerin mit 1 ml Phagen- oder Bakteriensuspension in Medium gemischt und bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

2.2.3. Klonierung in Plasmide

2.2.3.1. Restriktion und Ligierung

Die Konzentration der DNA-Fragmente wird nach den Angaben von Dugaiczky et al. (1975) errechnet. Die zu ligierenden DNA-Fragmente werden gemischt, 10 min auf 65°C erhitzt und auf 0°C abgekühlt. Folgende Bedingungen werden für die Ligierung gewählt, die für 3 h bei 4°C durchgeführt wird. Ein Ansatz von 10 µl enthält:

DNA	(nach Berechnung)
ATP pH 7,0	1 mM
Tris pH 8,0	60 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	10 mM
T4-Ligase	0,001 U/µl

2.2.3.2. Transformation von E. coli

Zur Aufnahme von DNA müssen Bakterien erst kompetent gemacht werden. Sie werden dazu in 100 ml LB-Medium bis O.D.₆₅₀=0,6 bei 37°C gezogen, 30 min auf Eis stengelassen und abzentrifugiert (5.000 rpm, Sorvall, GSA-Rotor, 5 min). Nach zweifachem Waschen für 5 min mit 50 ml 0,1 M CaCl₂ und Abzentrifugieren werden die Bakterien in 10 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis stehen gelassen.

Zur Transformation werden 0,2 ml Bakteriensuspension mit 0,1 ml in SSC/CaCl₂ gelöster DNA (0,5xSSC; 0,5 M CaCl₂) gemischt. Danach wird die Mischung für 30 min auf Eis gestellt, dann für 2 min bei 40°C und für 30 min auf Eis inkubiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Es werden in der Regel rund 10⁵ Kolonien pro µg DNA erhalten.

2.2.4. Klonierung in lambda-Phagen

2.2.4.1. Restriktion und Ligierung

lambda-Vektor-DNA und Fremd-DNA werden mit einer möglichst geringen Menge Hind III vollständig gespalten. Das Enzym wird durch zehnminütiges Inkubieren bei 60°C inaktiviert. Die Konzentrationen von Vektor- und Fremd-DNA wird nach Dugaicek et al. (1975) errechnet. Im Übrigen werden die Bedingungen verwendet, die unter 2.2.3.1. angegeben sind.

Vor der Zugabe der Ligase wird für 10 min nochmals bei 60°C inkubiert, um eventuell schon über "sticky ends" verbundene Fragmente wieder zu trennen. Nach 3 h bei 15°C wird die Ligierung bei 4°C über Nacht fortgesetzt.

2.2.4.2. Verpackung von DNA in vitro

(Hohn 1979)

Die E. coli-Stämme BHB 2688 und BHB 2690 enthalten lysogene lambda-Prophagen, die unter anderem jeweils einen Defekt in verschiedenen Kopfproteinen (E- bzw. D-Protein) haben. Aus diesen Stämmen werden zwei einander komplementierende Verpackungsextrakte ("Frier-Tau Lysat" und "Ultraschallextrakt") hergestellt. Eine Mischung beider Extrakte mit lambda-DNA liefert intakte Phagen.

2.2.4.2.1. Frier-Tau-Lysat ("freeze thaw lysate", FTL)

Eine Einzelkolonie von BHB 2688 Zellen wird auf zwei Agarplatten ausgestrichen, die anschließend bei 32°C und 42°C inkubiert werden. Wenn auf der 32°C Platte, nicht aber auf 42°C Platte Bakterien wachsen, werden 400 ml LB-Medium mit 5 Impfösen dieser Zellen angeimpft und bei 32°C bis O.D.₆₅₀ = 0,4 wachsen gelassen. Die lysogenen Phagen werden

nun bei 45°C 15 min lang induziert und weitere 3 h stark geschüttelt. Die Suspension wird in Eiswasser abgekühlt und abzentrifugiert (6500 rpm, GSA Rotor, 10 min). Nachdem auch die letzten Tropfen des Überstandes entfernt worden sind, wird der Niederschlag in 0,5 ml kalter 10% Sucrose, 0,05 M Tris (pH 7,4) resuspendiert und jeweils 0,5 ml dieser Suspension in ein eiskaltes 10 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt. Nach Zugabe von 30 µl frischer LysozymbLösung (2 mg/ml Lysozym in 10% Sucrose, 0,05 M Tris pH 7,4) wird die Suspension sofort in flüssigen N₂ eingefroren und bei -80°C über Nacht aufbewahrt. Dann werden die Röhrchen auf Eiswasser aufgetaut, 125 µl Ml Puffer (2% Merkaptoethanol; 6 mM Tris, pH 7,4; 30 mM Spermidin, pH 7,0; 60 mM Putrescin, pH 7,0; 18 mM MgCl₂; 15 mM ATP) zugegeben und die Zelltrümmer abzentrifugiert (35.000 rpm, Ti50 Rotor, 25 min, 2°C). Der Überstand wird in Aliquots von je 50 µl in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und in flüssigen N₂ eingefroren. FTLs können zwei Jahre lang ohne Aktivitätsverlust bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.4.2.2. Ultraschallextrakt ("sonic extract", SE)

BHB 2690 Zellen werden induziert und sedimentiert wie unter 2.2.4.2.1. beschrieben. Der Niederschlag wird in 3 ml Puffer A (20 mM Tris pH 8,0; 3 mM MgCl₂; 10 mM Merkaptoethanol; 1 mM EDTA) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (pulsierend, 15 min) lysiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 6.000 rpm, SS34 Rotor) wird zum Überstand 0,6 ml Ml Puffer gegeben und in Aliquots von je 25 µl in Eppendorf-Röhrchen in flüssigen N₂ eingefroren. Die Aktivität bleibt bei Lagerung bei -80°C für mindestens zwei Jahre erhalten.

2.2.4.2.3. Verpackung und Ausplattieren

In Testansätzen werden nach Auftauen der Verpackungsextrakte zuerst 2 μ l SE mit 1-2 μ l λ DNA (100 ng) für eine Minute langsam verrührt. Nach Zugabe und Verrühren von 10 μ l FTL wird die Mischung 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann auf 300 μ l mit VFM (2.2.2.1.) aufgefüllt. Die Phagen werden in VFM weiter verdünnt und titriert (2.2.2.3.). Die Titerbestimmung ist auch notwendig, um für das Plaque-Hybridisierung (2.2.4.3.4.) die richtige Menge einsetzen zu können. Als Kontrolle werden ungeschnittene und geschnittene λ -DNA und Bakterien ohne Phagen ausplattiert.

2.2.4.3.4. Plaque-Hybridisierung

(Benton & Davis 1977)

Diese Methode erlaubt die Identifizierung von Plaques, die spezifische DNA-Sequenzen enthalten. Dazu werden Phagen mit geeigneten Bakterien und mit Weichagarose (anstatt Weichagar) auf LB-Platten (mit 10 mM $MgSO_4$) ausplattiert, so daß die Plaques vereinzelt vorliegen. Nach Inkubation über Nacht bei 37-40°C werden die Platten für 30 min bei 4°C abgekühlt. Zwei Nitrozellulosefilter werden übereinander auf eine Platte gelegt und mit einer Nadel zur Markierung mehrmals durch Filter und Agarschicht gestochen. Die Einstiche werden auf der Plattenunterseite angezeichnet. Nach erneutem Kühlstellen für 30 min werden die Filter abgenommen, für 5 min mit 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl, für 5 min mit 1 M Tris (pH 7,4) / 1,5 M NaCl und für 5 min mit 0,5 M Tris (pH 7,4) / 1,5 M NaCl behandelt. Nach Trocknen an der Luft werden sie für 3 h im Vakuum bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Probe erfolgt wie unter 2.2.1.8. angegeben. Nach Autoradiographie der Filter kann der positive Plaque anhand des Hybridisierungssignals und der Einstiche in Filter und Platte gefunden und isoliert werden.

2.2.5. Zellkultur

PLC/PRF/5-, Ltk- und NIH3T3-Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Morton 1970) gezogen. Das Medium enthält 50 µg/ml Kanamycin-Sulfat und 10% fetales Kälberserum (im Fall von NIH3T3 10% Serum von neugeborenen Kälbern), das 30 min bei 56°C inaktiviert worden war. Die Zellen werden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wird das Medium gewechselt. Ltk-positive Zellen wachsen in HAT-Medium (auf 1l: 13,6 mg Hypoxanthin; 0,18 mg Aminopterin; 3,9 mg Thymidin).

Wenn die Zellen einen konfluenten Rasen gebildet haben, werden sie passagiert: Die Zellen werden mit PBS (auf 1 l: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na₂HPO₄·H₂O; 0,2 g KH₂PO₄) gewaschen, mit einer minimalen Menge an 0,25%igem Trypsin überschichtet und 15 min bei 37°C inkubiert. Die vom Boden abgelösten Zellen werden in Medium aufgenommen und in einem größeren Kulturgefäß ausgesät.

Zellen können in DMEM, 10% DMSO, 15% Serum in einem speziellen Gerät (Cryoson) biologisch eingefroren werden, um sie lange bei -80°C lagern zu können.

2.2.6. Transfektion eukaryotischer Zellen

(Graham & van der Eb 1973)

Zellen werden nach der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. 6×10^5 Zellen (NIH3T3 oder Ltk) werden in einer 10 cm Petrischale ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Medium gewechselt und 3 h später das DNA-Präzipitat zugegeben. Am nächsten Tag wird wieder Medium gewechselt und dann alle 2-3 Tage (Ltk) oder alle 4 Tage (NIH3T3) das Medium gewechselt.

Das DNA-Präzipitat wird folgendermaßen hergestellt: 20 µg

durch Ethanol-fällung sterilisierte DNA (verschiedene Mengen Plasmid DNA, hochmolekulare Kalbsthymus-DNA; zusammen 20 µg) werden in 185 µl TE-Puffer (2.2.1.1.) gelöst. Dazu wird 250 µl HEPES-Puffer (21 mM HEPES; 0,145 M NaCl; 0,7 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) gegeben. Während durch eine Pasteurpipette Luft in die Lösung geblasen wird, um für eine gute Durchmischung zu sorgen, wird tropfenweise 60 µl 2,5 M CaCl_2 zu der DNA-Lösung gegeben und dann für einige Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach kurzem Schütteln wird das DNA-Präzipitat auf die Zellen geträufelt und verteilt.

14 Tage nach der Transfektion werden bei NIH3T3-Zellen unter Verwendung von transformierender DNA Foci sichtbar. Ltk-Zellen werden 36-48 h nach der Transfektion zur Selektion auf tk-positive Zellen mit HAT-Medium gezogen. Die Kolonien, die näher untersucht werden sollen, werden 14-17 Tage nach der Transfektion mit Klonierungszyklindern isoliert, in kleine Flaschen überführt und später als Massenkulturen gezogen.

2.2.6.1. Radioimmunassay für HBsAg

HBsAg wird mit dem AUSRIA II-125 Test (Abbott) aus Zellüberständen bestimmt.

2.3. Sicherheit

Alle Arbeiten mit rekombinanten Bakteriophagen oder plasmidhaltigen Bakterien, die HBV-spezifische oder eukaryotische DNA-Sequenzen enthalten, wurden im L3-Labor der Abteilung Virusforschung im Max-Planck-Institut für Biochemie ausgeführt.

2.4. Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cpm	Impulse pro Minute
d	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
g	Gramm
h	Stunde
HBc / HBcAg	Hepatitis-B-Kapsid(Core) / -Antigen
HBe / HBeAg	Hepatitis-B-e / -Antigen
HBs / HBsAg	Hepatitis-B-Oberflächen(Surface) / -Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	Molar
Md	Megadalton
mM	Millimolar
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
um	Mikrometer
nm	Nanometer
O.D.	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge in nm
pfu	plaque forming units
³² P	radioaktives Isotop von Phosphor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit (unit)

3. ERGEBNISSE

3.1. Integrierte HBV-DNA im Genom der PLC/PRF/5-Zelllinie

Wie schon von verschiedenen Arbeitsgruppen (Brecht et al. 1980, Edman et al. 1980, Gray et al. 1980) durch Southern Analyse gezeigt, enthalten die PLC/PRF/5-Zellen integrierte HBV-DNA. Bei der Analyse wurde in allen Fällen das Restriktionsenzym Hind III verwendet. Da von den damals bekannten HBV-Genomen (Galibert et al. 1979, Pasek et al. 1979, Valenzuela et al. 1980) keines eine Erkennungsstelle für dieses Enzym hat, sollte dieses Enzym die DNA aus PLC/PRF/5-Zellen nur in humanen Bereichen und nicht im HBV-Anteil schneiden. Die so entstehenden Fragmente mit integrierter HBV-DNA müßten deshalb virale DNA enthalten, die auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert ist. Wenn das HBV-Genom von 3,2 kb vollständig integriert, müssen diese Fragmente mit viraler DNA größer als 3,2 kb sein, was auch der Fall ist. In der Southern Analyse konnte ein Bandenmuster von 32, 25, 18, 11, 6 und 4 kb mit den im Labor kultivierten PLC/PRF/5-Zellen wie in der Literatur beschrieben reproduziert werden (Abb. 4a). Als Hybridisierungsprobe diente dabei klonierte HBV-DNA (pAO1-HBV; Cummings et al. 1980). Bei manchen dieser Analysen ist allerdings zusätzlich eine 1,9 kb-Bande sichtbar, welche durch die skizzierte Modellvorstellung nicht erklärbar ist (Abb. 4b).

Zur weiteren Charakterisierung der integrierten, viralen DNA wurde das Enzym Eco RI verwendet, das nur eine Erkennungsstelle im HBV-Genom hat. Durch dieses Enzym sollte jede der integrierten HBV-Kopien zwei mit HBV-DNA hybridisierbare Banden ergeben. Da nach Analyse mit Hind III reproduzierbar mindestens 6 Kopien vorhanden sind, werden 12 Banden nach Schnitt mit Eco RI erwartet. Tatsächlich sieht man aber nur 10 Banden (Abb. 4c, d). Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß tatsächlich 12 Banden vorhanden sind, einige sich aber wegen gleicher Größe nicht auf dem

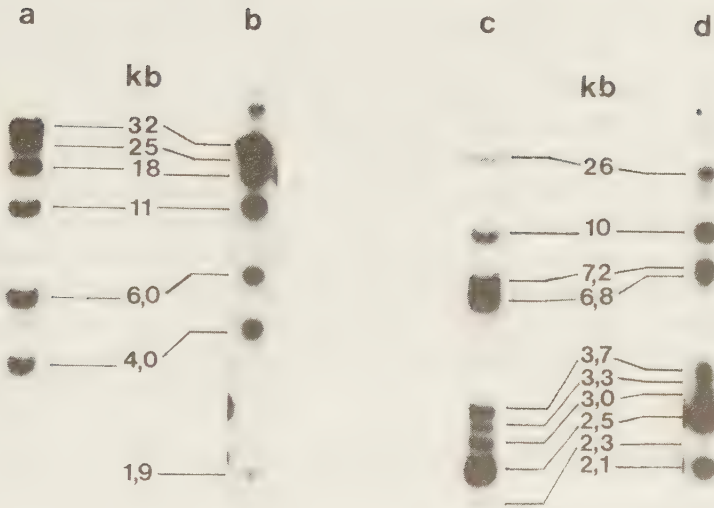


Abb. 4: Southern Analyse der PLC/PRF/5-DNA

DNA der PLC/PRF/5-Zellen wurde mit Hind III (a, b) und Eco RI (c, d) geschnitten; auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nirozellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert. Die Größe der HBV-DNA enthaltenden Banden ist in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

Gel voneinander trennen lassen.

Auffällig ist bei den Eco RI-Banden (Abb. 4c, d), daß die Signale unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Vermutlich liegt die Ursache darin, daß HBV-DNA in einigen Fällen in tandemartiger Konfiguration integriert vorliegt. Da Eco RI in der HBV-DNA schneidet, entstehen nach Schnitt mit diesem Enzym Fragmente von Genomlänge, die häufiger als diejenigen mit unterschiedlichem, humanen Anteil vorkommen. Allerdings sind die besonders intensiven Eco RI-Banden von 2,5 kb bzw. 2,1 kb kleiner als die Genomlänge. Deshalb muß die HBV-DNA in diesen postulierten, tandemartigen Integraten Deletionen enthalten. Darauf wird im Kapitel 3.4.7. noch näher eingegangen.

3.2. Klonierung der integrierten HBV-DNA

Ziel der Experimente ist es, Struktur und Funktion der integrierten HBV-DNA und der benachbarten humanen DNA zu untersuchen. Deshalb sollten aus der PLC/PRF/5-DNA Fragmente kloniert werden, die sowohl aus viraler als auch aus humaner DNA bestehen. Weil HBV-DNA eine Eco RI-Stelle besitzt, enthalten die Eco RI-Fragmente erwartungsgemäß nur eine der beiden humanen Flanken, oder im Fall tandemartiger Integrate überhaupt keine humane DNA. Deshalb bot sich die Klonierung der Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA an. Der benötigte Vektor muß folglich eine geeignete Hind III-Stelle enthalten. Eine weitere Voraussetzung für die erfolgreiche Klonierung eukaryotischer DNA-Fragmente ist ein System, das auf relativ einfache Weise erlaubt, aus einer großen Zahl von Klonen die gewünschten herauszufinden.

Die 47 kb große lambda-DNA besitzt 6 Hind III-Stellen. Geht man davon aus, daß sie eine für große Genome repräsentative Basenverteilung besitzt, sollte Hind III das humane Genom von 4×10^6 kb in rund 5×10^5 unterschiedliche Fragmente zerlegen, von denen im Fall der Zelllinie PLC/PRF/5

nur sechs integrierte HBV-DNA enthalten. Das Klonierungssystem muß also so effizient sein, daß ausgehend von einer geringen DNA-Menge alle entstehenden Fragmente kloniert werden, aus denen dann die wenigen gesuchten isoliert werden.

Vor allem wegen der hohen Klonierungseffizienz wurde für das Erstellen einer solchen Genbank das Vektorsystem des Bakteriophagen lambda gewählt (Maniatis 1978). Die hohe Effizienz wird mit Hilfe der in-vitro-Verpackung (Hohn 1979) erreicht. Diese Technik ist bei Plasmiden wie pBR322 nicht anwendbar. Aus der großen Anzahl rekombinanter Phagen läßt sich schließlich auf einer relativ kleinen Fläche durch Plaque-Hybridisierung (Benton & Davis 1977) der gesuchte Klon leicht identifizieren.

3.2.1. Bakteriophage lambda als Vektor

Die Kapazität eines lambda-Vektors für fremde DNA ist nach oben durch das Volumen des Phagenkopfes begrenzt (Enquist & Sternberg 1979). Mehr als 108% (51 kb) der normalen Genomlänge (47 kb) kann der Kopf nicht fassen. Wird eine minimale DNA-Länge von 34 kb (73%) unterschritten, führt die Verpackung dieser DNA zu nicht-lebensfähigen Phagen. Um Platz für die fremde DNA zu schaffen, müssen bei der Konstruktion von lambda-Vektoren nicht-essentielle Bereiche des Phagenkopfes eliminiert werden.

Der lambda-Vektor 762 (Abb. 5; Murray et al. 1977) ist für die Klonierung der gewünschten Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA sehr gut geeignet. Durch Schnitt mit Hind III werden die Vektorarme vom supF-Fragment getrennt. Das supF-Fragment wird bei der Klonierung gegen Fremd-DNA ausgetauscht, weswegen 762 auch als "Replacement-Vektor" bezeichnet wird. Die Aufnahmekapazität des Vektors 762 für Fremd-DNA reicht von 2 bis 18 kb, ermöglicht also die Klonierung der vier kleineren HBV-DNA enthaltenden

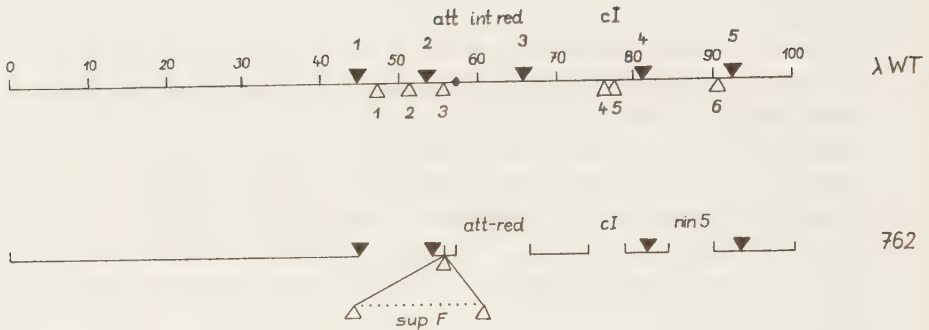


Abb. 5: Genomkarte des Bakteriophagen lambda und des lambda-Vektors 762

Die Karte des Wildtyp(WT)-Phagen lambda dient als Vergleich zu der des lambda-Vektors 762 (Murray et al. 1977). Die Lage einiger viraler Gene bzw. die Deletion dieser Gene ist angegeben. Die Restriktionsstellen für Eco RI sind durch gefüllte Dreiecke, die für Hind III durch offene Dreiecke dargestellt. Im Vektor 762 ist nur die Hind III-Stelle 3 erhalten, in welche die DNA des bakteriellen Gens *supF* kloniert ist.

Hind III-Banden der PLC/PRF/5-DNA.

Neben geeigneten Schnittstellen für die Klonierung muß ein lambda-Vektor aber auch noch andere Kriterien erfüllen. Unerwünscht ist die Integration der Vektor-DNA in das bakterielle Genom, weswegen bei 762 die Gene att und int deletiert sind (Abb. 5). Die Deletion des cI-Gens, die dem Phagen nur noch den lytischen Zyklus erlaubt, gewährleistet eine gute Vermehrung des Phagen. Wichtig ist auch das Fehlen der Rekombinationsfähigkeit (red), welches verhindert, daß die Fremd-DNA nachträglich durch Deletionen, Insertionen oder Inversionen verändert wird.

Aber auch das *E. coli* Wirtsbakterium (490A) muß bestimmte Eigenschaften haben, um zur Klonierung eukaryotischer DNA geeignet zu sein. Wie beim Phagen darf die Fähigkeit zur Rekombination (recA) nicht vorhanden sein. Unbedingt notwendig ist außerdem das Fehlen von Restriktionsendonukleasen (hsd_R), da die zu klonierende, humane DNA nicht durch Modifikation vor diesen Enzymen geschützt ist. Die DNA des rekombinanten Phagen würde in diesem Fall zerstört werden.

Beide Eigenschaften wurden getestet. Die recA-Mutation läßt sich durch Sensitivität gegen Methanmethylsulfonat (MMS), das die DNA schädigt, nachweisen. Nur Zellen mit einem intakten DNA-Reparatursystem, bei dem auch Rekombination und damit das recA-Gen notwendig sind, können überleben. Das Fehlen von Restriktionsendonukleasen wurde mit einem Phagenlysate überprüft, das unter Verwendung des zu testenden *E. coli*-Stamms 490A hergestellt wurde. Diese Phagen wurden auf *E. coli* 490A und auf *E. coli* C600, einem Stamm der Endonukleasen enthält, titriert. Das Verhältnis der Plaque-Anzahl auf C600 ($5,0 \times 10^5$ pfu/ml) zu der auf 490A ($2,2 \times 10^9$ pfu/ml) ist $2,3 \times 10^{-4}$; und zeigt damit, daß die Phagen-DNA nicht vor Endonukleasen geschützt ist. Dadurch ist nachgewiesen, daß 490A DNA nicht modifizieren kann (hsd_M). Dieser Stamm muß folglich, um lebensfähig zu sein,

auch einen Defekt im Restriktionssystem aufweisen (hsd_R).

3.2.2. Optimierung der Klonierung

Wird bei der Ligierung 762- und PLC/PRF/5-DNA, die beide mit Hind III geschnitten sind, eingesetzt, so entsteht nach der DNA-Verpackung ein großer Anteil von Phagen, die nicht humane DNA, sondern das ursprünglich vorhandene supF-Fragment enthalten. Um den Prozentsatz an parentalen Phagen drastisch zu verringern, wurden die Vektorarme (21,8 kb und 11,7 kb) über ein präparatives Agarosegel vom supF-Fragment (7,7 kb) abgetrennt, und aus dem Gel durch Elektroelution isoliert.

Um die relative Anzahl der gesuchten, rekombinanten Phagen weiter zu erhöhen, wurde auch die PLC/PRF/5-DNA über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Ein Teil des Gels wurde auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert. Entsprechend den positiven Banden auf der Autoradiographie wurden die Bereiche des Gels ausgeschnitten und die DNA eluiert. Eine weitere Southern Analyse eines analytischen Gels bestätigte, daß die richtigen DNA-Fragmente isoliert worden waren, denn die Banden der erwarteten Größen hybridisieren mit HBV-DNA (Abb. 6).

Bei der Ligierung muß die Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente so gewählt werden, daß die Bildung von Polymeren, die aus Vektor und humaner DNA bestehen, bevorzugt ist. Ist die Konzentration zu gering, entstehen überwiegend monomere Ringe, die für die Klonierung wertlos sind. Die Arbeit von Dugaicyk et al. (1975) liefert die Formeln für die Berechnung der notwendigen DNA-Konzentrationen. Dabei bedeuten i die Anzahl der Molekülen pro ml, j die Anzahl der Enden in der Nachbarschaft des anderen Endes des selben Moleküls pro ml, (DNA) die DNA-Konzentration in g/l, und MW das Molekulargewicht in Dalton (d). Es

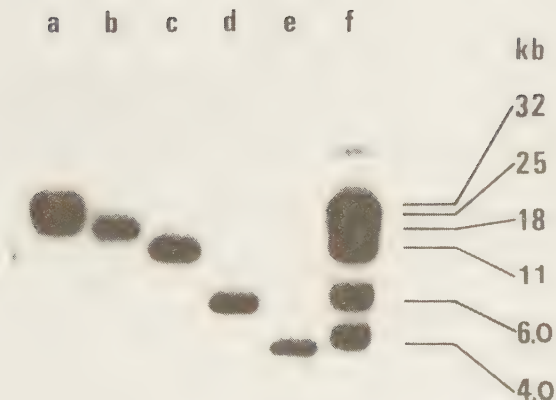


Abb. 6: Isolierung der humanen DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA

Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA wurden auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, die mit HBV-DNA hybridisierenden Bereiche wurden ausgeschnitten und die DNA eluiert. Eine Southern Analyse der isolierten Fragmente, bei der mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert wurde, zeigt, daß die richtigen Fragmente der Größe 32 kb, 25 kb, 18 kb (a), 18 kb (b), 11 kb (c), 6,0 kb (d) und 4,0 kb (e) isoliert wurden. Als Vergleich dazu dient mit Hind III geschnittene PLC/PRF/5-DNA (f).

gelten folgende Gleichungen:

$$(1) i = 12,044 \times 10^{20} \times (\text{DNA}) : \text{MW}$$

$$(2) (\text{DNA}) = i \times \text{MW} : (12,044 \times 10^{20})$$

$$(3) (\text{DNA}) = 51,1 : (\text{MW}^{0,5} \times j/i)$$

Werte für j/i kleiner als 1 führen zur Bildung von Polymeren, diejenigen für j/i größer als 1 zu monomeren Ringen.

Für die Vektorarme ergibt sich bei 762:

$$21,8 \text{ kb} = 14,4 \text{ Md, bzw.}$$

$$11,7 \text{ kb} = 7,7 \text{ Md, insgesamt also}$$

$$22,1 \text{ Md;}$$

Für das supF-Fragment:

$$7,7 \text{ kb} = 5,1 \text{ Md.}$$

Für ein Modellexperiment werden im Folgenden die Bedingungen für die Ligierung des supF-Fragments berechnet. Wird vom Grenzwert zwischen der Bildung von Polymeren und Ringen ($j/i = 1$) ausgegangen, errechnet sich aus (3) für supF die Konzentration der DNA 0,022 g/l, aus (1) die Anzahl der Enden mit $5,19 \times 10^{12}/\text{ml}$. Soll das supF-Fragment mit den Vektorarmen ligiert werden, muß ein entsprechender Anteil dieser Enden vom Vektor gestellt werden. Für das Verhältnis von Vektor : Insert = 2 : 1 ist der Vektoranteil $3,46 \times 10^{12}/\text{ml}$, der Insertanteil $1,73 \times 10^{12}/\text{ml}$. Mit diesen Werten ergibt sich aus (3) eine DNA-Konzentration für das supF-Fragment von 0,0073 g/l, für die Vektorarme von 0,063 g/l.

Für die Ligierung der gewünschten Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA errechnen sich folgende Werte. Für ein 4 kb großes Insert ergeben sich Konzentrationen von 0,011 g/l bzw. für die Vektorarme von 0,18 g/l, für ein 11 kb großes Insert 0,0063 g/l bzw. 0,038 g/l, und für ein 18 kb großes Insert 0,0049 g/l bzw. 0,018 g/l. Bei höherer Konzentration an Vektor- und Insert-DNA wird der Wert j/i kleiner als 1 und damit die Bildung polymerer DNA bevorzugt.

Nach den für das supF-Fragment errechneten DNA-Konzentra-

tionen wurde als Test ein Ligationsansatz mit den aus dem Gel eluierten Fragmenten des supF und der Vektorarme von 762 in 10 ul durchgeführt. Die DNA wurde in vitro verpackt und die entstandenen Phagen titriert (Tab. 1).

Tabelle 1: Titration der Vektor-Phagen auf 490A

	pfu/ug Vektorarme
762, ungeschnitten	$7,1 \times 10^6$
762, Hind III	$2,6 \times 10^3$
762, Hind III, ligiert	$8,8 \times 10^5$
762 Arme + supF	$1,7 \times 10^3$
762 Arme + supF, ligiert	$4,4 \times 10^5$
762 Arme, ligiert	$8,8 \times 10^3$

Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen (Maniatis 1978). Deshalb wurden die beschriebenen Versuchsbedingungen immer eingehalten.

3.2.3. Klonierungsergebnisse

Für das eigentliche Klonierungsexperiment wurden Hind III-geschnittene, vom Gel eluierte DNA-Fragmente des PLC/PRF/5-Genoms der Größen 4, 11 und 18 kb eingesetzt. Es wurden nur diese drei Größen ausgewählt, da die Fragmente über 18 kb zu groß für den lambda-Vektor 762 sind und das HBV-DNA enthaltende 6 kb-Fragment bereits in diesem Labor kloniert worden war (von Dr. R. Koshy und A. Freytag von Loringhoven). Nach der Ligierung, die entsprechend der Berechnung unter 3.2.2. durchgeführt wurde, und der DNA-Verpackung wurden je 50.000 Phagen auf einer großen Agarplatte (500 cm²) ausplattiert. Insgesamt wurden pro Fragment rund 250.000 Phagen ausplattiert. Von jeder Platte wurden die Plaques auf zwei Nitrozellulosefilter übertragen und mit ³²P-markierter HBV-DNA hybridisiert. Schwärzungen auf den

Autoradiographien der zwei zusammengehörigen Filter wurden nur dann positiv gewertet, wenn sie auf beiden Autoradiographien an der gleichen Stelle auftraten. Die Experimente mit dem 4 kb-Fragment ergaben drei, mit dem 11 kb-Fragment fünf und mit dem 18 kb-Fragment keine positiven Signale auf den Autoradiographien. Offenbar überschritt im letzten Fall die Größe des HBV-DNA enthaltenden Fragments doch die Aufnahmekapazität des Vektors.

Anhand der Autoradiographie wurde auf der Agarplatte die Region lokalisiert, in welcher der positive Plaque lag. Diese Stelle wurde abgenommen, die Phagen entsprechend verdünnt, ausplattiert und anschließend der gesuchte Klon durch erneute Plaque-Hybridisierung identifiziert.

Von allen so erhaltenen Klonen wurden zunächst in kleinem Maßstab Phagenlysate gezogen und daraus DNA isoliert, die für die ersten Restriktionskartierungen verwendet wurde. Dabei zeigte sich, daß bei der Klonierung des 11 kb-Fragments zwei verschiedene Fragmente erhalten wurden, die sich mit 10,7 kb und 10,5 kb auch etwas in der Größe unterscheiden. Die klonierten DNA-Fragmente werden entsprechend ihrer Länge bezeichnet. So stammen die DNA-Fragmente A-4,0 aus der 4 kb-Bande, A-6,0 aus der 6 kb-Bande, und die beiden Fragmente A-10,5 und A-10,7 aus der 11 kb-Bande.

Da die DNA-Ausbeuten aus den rekombinanten Phagen niedrig sind, wurden die PLC/PRF/5-Fragmente in ein Plasmid (pBR327; Soberon et al. 1980) rekloniert. Auch für die DNA-Sequenzierung ist es vorteilhaft, wenn mit Plasmiden gearbeitet werden kann. Sofern erforderlich, werden im Folgenden die Klonierungsvektoren mit 1 (für λ ; z.B. 1A-4,0) oder p (für Plasmid; z.B. pA-4,0) angegeben.

3.3. Restriktionskartierung der Klone

Bei der Restriktionskartierung wird die Lage der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme auf dem zu untersuchenden DNA-Stück bestimmt. Im vorliegenden Fall wurden die aus dem PLC/PRF/5-Genom klonierten Hind III-Fragmente kartiert. Eine Zuordnung der verschiedenen DNA-Bruchstücke, die durch die einzelnen Enzyme entstehen, wurde durch Kombination jeweils zweier Enzyme ermöglicht. Erleichtert wurde die Erstellung der physischen Karte durch Hybridisierung der Fragmente mit ^{32}P -markierter HBV-DNA.

Die Restriktionskarten aller vier klonierter Fragmente sind in Abbildung 7 zu sehen. Die Kartierung von A-6,0 und A-10,7 wurde von A. Freytag von Lorinhoven (1984) durchgeführt. Die selbst erstellten Karten für A-4,0 und A-10,5 werden im Folgenden näher beschrieben.

3.3.1. Kartierung von A-4,0

Das Plasmid pA-4,0 ergibt nach Inkubation mit Hind III (Abb. 8b) zwei Banden von 3,3 kb (pBR327) und 4,0 kb (das klonierte Insert). Eco RI schneidet das 4,0 kb-Fragment in Subfragmente von 0,34 kb und 3,7 kb (Abb. 8c, 9). Pst I zerlegt das 4,0 kb große Hind III-Fragment in drei Subfragmente von 2,2 kb, 1,2 kb und 0,6 kb (Abb. 8n, 9). Sowohl durch Schnitt mit Pst I und Hind III als auch durch Pst I allein ergibt das Plasmid pA-4,0 ein Fragment von 1,2 kb (Abb. 8n, o, 9). Dieses Fragment stammt nicht aus pBR327, und muß deshalb innerhalb des 4,0 kb-Inserts liegen. Das 2,2 kb- und das 0,6 kb-Fragment müssen das 1,2 kb-Fragment flankieren. Nur die 2,2 kb-Bande wird von Eco RI geschnitten (Abb. 8p, 9). Damit ist die Reihenfolge und die Orientierung der Fragmente in Bezug auf die Eco RI-Stelle festgelegt. Die Tth I-Fragmente können auf die gleiche Weise wie die Pst I-Fragmente zugeordnet werden (Abb. 8s, t, u, 9).

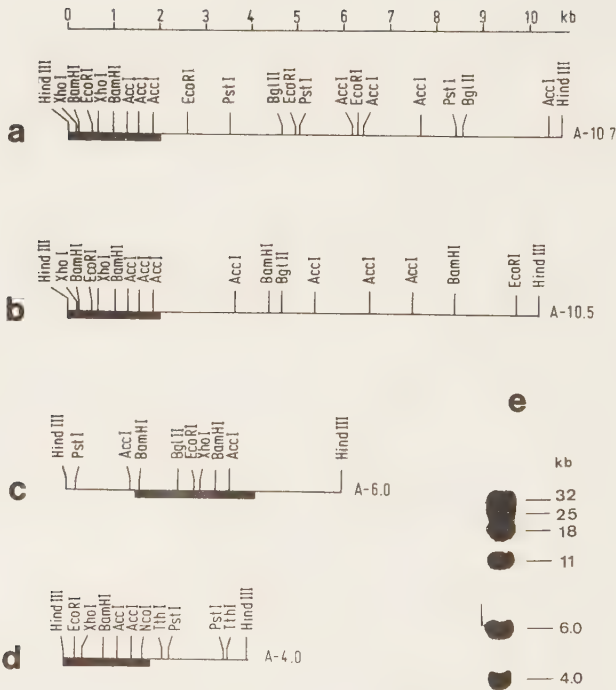


Abb. 7: Restriktionskarten der humanen Fragmente mit integrierter HBV-DNA

Die humanen Bereiche der aus der PLC/PRF/5-DNA klonierten Hind III-Fragmente A-10,7 (a), A-10,5 (b), A-6,0 (c) und A-4,0 (d) sind dünn, die HBV-Anteile fett gezeichnet. Die klonierten Fragmente entsprechen den mit HBV-DNA hybridisierenden Banden der Größe 11 kb (A-10,7 und A-10,5), 6,0 kb (A-6,0) und 4,0 kb (A-4,0), die aus der PLC/PRF/5-DNA durch das Enzym Hind III entstehen.

Da nur das 2,2 kb-Pst I-Hind III- und das 2,1 kb-Tth I-Hind III-Fragment mit HBV-DNA hybridisieren (Abb. 8n, t), kann der virale Anteil im Klon höchstens 2,1 kb betragen. Die Eco RI-Stelle liegt in der HBV-DNA, da sowohl das 0,34 kb- wie das 3,7 kb-Hind III-Eco RI-Fragment mit der viralen DNA hybridisieren (Abb. 8c). Mit Xho I und Bam HI entstehen jeweils ein kleines und ein großes Subfragment von 0,45 kb und 3,6 kb (Abb. 8k, 9) bzw. 0,84 kb und 3,2 kb (Abb. 8h, 9). Da auch die kleinen Fragmente mit HBV-DNA hybridisieren, müssen sie im viralen Teil und damit in der Nähe der Eco RI-Stelle liegen.

Durch Acc I wird das 4,0 kb-Hind III-Fragment in 2,6 kb, 1,15 kb und 0,24 kb große Stücke zerlegt (Abb. 8e, 9). Das 0,24 kb-Subfragment entsteht auch durch Acc I allein, liegt also innerhalb des 4,0-Fragments (Abb. 8f, 9). Da alle drei Fragmente mit HBV-DNA hybridisieren, der HBV-Anteil aber höchstens 2,1 kb beträgt, müssen die 1,15 kb und 0,24 kb großen Stücke im 2,1 kb-Tth I-Fragment liegen. Nco I zerschneidet das 4,0 kb-Hind III-Fragment in einen 2,3 kb und einen 1,7 kb großen Teil (Abb. 8v, 9). Das 1,7 kb-Fragment wird von Eco RI in ein 1,4 kb und ein 0,34 kb großes Stück zerlegt (Abb. 8w, 9). Damit ist auch die Lage der Nco I-Stelle festgelegt.

Da die Sequenzen zwischen der Nco I- und der ihr benachbarten Tth I-Stelle noch mit HBV-DNA hybridisieren (das 2,3 kb-Nco I-Hind III-Fragment enthält virale DNA; Abb. 8v), die jenseits dieser Tth I-Stelle befindlichen Sequenzen in der Hybridisierung aber negativ sind, ist der Übergang zwischen viraler und humaner DNA in dem Nco I-Tth I-Fragment lokalisiert. Der Übergang auf der anderen Seite der integrierten HBV-DNA kann sich nur, wenn überhaupt im Klon vorhanden, zwischen der Eco RI- und der 0,34 kb entfernt liegenden Hind III-Stelle befinden.

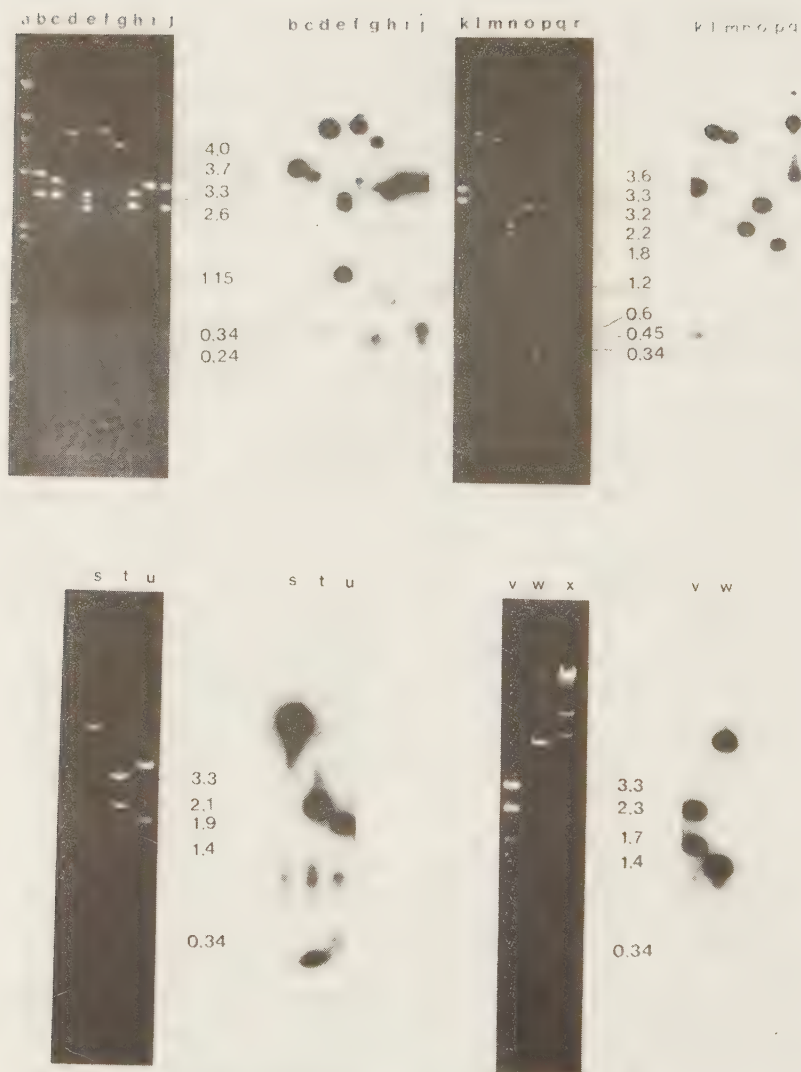


Abb. 8

Abb. 8: Restriktionskartierung von A-4,0

Von den Restriktionsanalysen des Plasmids pA-4,0 ist jeweils das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel und die Autoradiographie der Southern Analyse, bei der ^{32}P -markierte HBV-DNA verwendet wurde, gezeigt. Die Größe der Fragmente sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Das Plasmid pA-4,0 (q) ist geschnitten mit Hind III (b), Hind III und Eco RI (c), Eco RI (d), Hind III und Acc I (e), Acc I (f), Acc I und Eco RI (g), Hind III und Bam HI (h), Bam HI (i), Bam HI und Eco RI (j), Hind III und Xho I (k), Xho I (l), Xho I und Eco RI (m), Hind III und Pst I (n), Pst I (o), Pst I und Eco RI (p), Tth I (s), Hind III und Tth I (t), Tth I und Eco RI (u), Hind III und Nco I (v), Nco I und Eco RI (w). Als Größenmarker wurde lambda cI, geschnitten mit Hind III (a, r, x), verwendet.

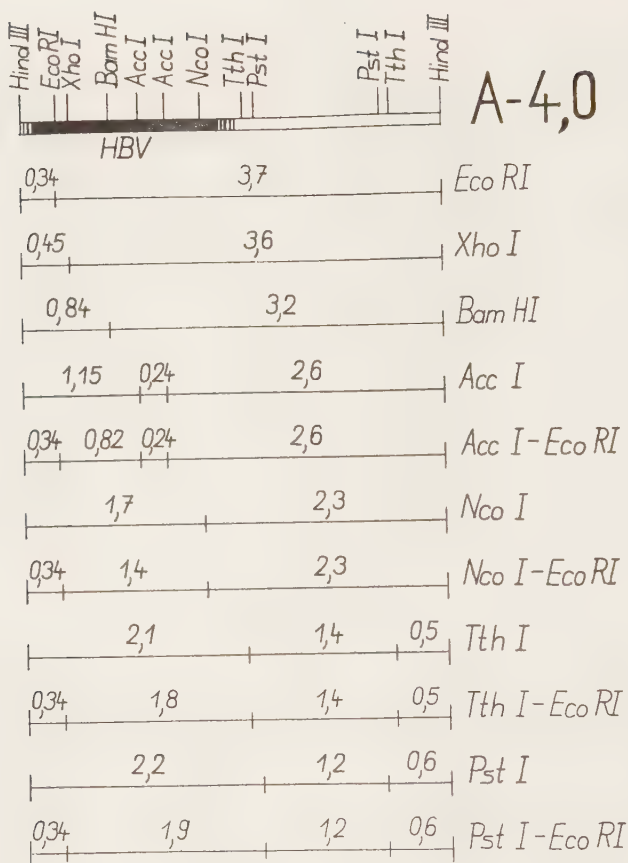


Abb. 9: Restriktionskarte von A-4,0

Die Größen der durch verschiedene Restriktionsenzyme entstehenden Subfragmente des Hind III-Fragments A-4,0 sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Aus diesen Daten ergibt sich die oben dargestellte Restriktionskarte, in welcher der mit HBV-DNA hybridisierende Teil fett gezeichnet ist. Da die Ausdehnung der HBV-DNA mit Hilfe der Southern Analyse nur grob bestimmt werden kann, sind die Bereiche schraffiert, in denen der Übergang zwischen viraler und humaner DNA liegen kann.

3.3.2. Kartierung von A-10,5

Am Beispiel von A-4,0 wurde ausführlich die Kartierungsstrategie dargestellt. Da bei einem 10,5 kb großen DNA-Stück viel mehr Restriktionsfragmente entstehen, ist die Kartierung der Restriktionsstellen schwieriger. Während bei A-4,0 die Schnittstellen eines Enzyms durch Kombination dieses Enzyms mit Eco RI eindeutig festgelegt werden können, ist bei A-10,5 die Kombination mit mehreren Enzymen notwendig. Im Folgenden werden deshalb nur die Restriktionsstellen beschrieben, deren Kartierung einfach ist, oder die für die Analyse der integrierten HBV-DNA wichtig sind.

Für die Kartierung wurde das über ein präparatives Agarosegel gereinigte 10,5 kb-Hind III-Fragment aus 1A-10,5 verwendet. Dieses DNA-Stück zerfällt bei Inkubation mit Bgl II in ein 5,6 kb und ein 4,7 kb großes Fragment, von denen nur das letztere mit HBV-DNA hybridisiert (Abb. 10j, r, 11). Das 4,7 kb-Fragment wird durch Eco RI in Subfragmente der Größe 4,2 kb und 0,47 kb gespalten (Abb. 10n, 11). Auch das 0,47 kb-Stück enthält HBV-DNA. Ein Pst I-Fragment von 3,4 kb (Abb. 10f, o, 11), das mit viraler DNA hybridisiert, wird ebenfalls mit Eco RI geschnitten, wobei HBV-positive Banden von 2,9 kb und 0,47 kb entstehen (Abb. 10g, 11). Die integrierte HBV-DNA ist damit schon auf einen 3,4 kb großen Bereich lokalisiert.

Die Region um die virale Eco RI-Stelle kann durch Schnitt mit Bam HI und Xho I noch genauer charakterisiert werden. In beiden Fällen entstehen neben großen auch sehr kleine Fragmente von 0,76 kb bzw. 0,45 kb, die HBV-DNA enthalten (Abb. 10d, i, 11). Beide Fragmente werden von Eco RI geschnitten. Die entstehenden Subfragmente von 0,46 kb und 0,30 kb (Abb. 10c) bzw. 0,33 kb und 0,115 kb (Abb. 10h) weisen darauf hin, daß beim Schnitt mit Bam HI und Xho I noch weitere sehr kleine Fragmente von 0,17 kb bzw. 0,135 kb vorliegen, die auf einer Seite von der an diesem Ende des Inserts liegenden Hind III-Stelle begrenzt werden (Abb. 11).

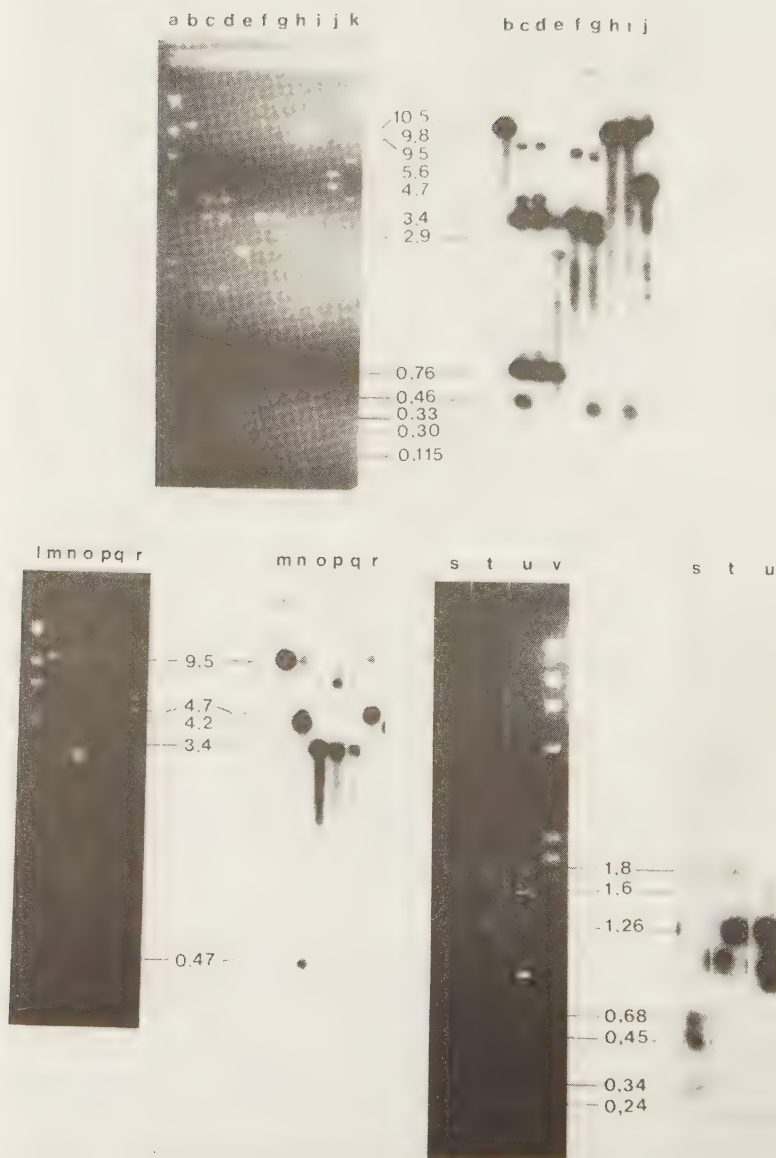


Abb. 10

Abb. 10: Restriktionskartierung von A-10,5

Von den Restriktionsanalysen des isolierten Inserts A-10,5 ist jeweils das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel und die Autoradiographie der Southern Analyse, bei der ^{32}P -markierte HBV-DNA verwendet wurde, gezeigt. Die Größe der Fragmente sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Das Insert A-10,5 (b) ist geschnitten mit Eco RI und Bam HI (c), Bam HI (d), Bam HI und Pst I (e), Pst I (f), Eco RI und Pst I (g), Eco RI und Xho I (h), Xho I (i), Bgl II (j), Eco RI (m), Eco RI und Bgl II (n), Pst I (o), Pst I und Bgl II (p), Bgl II und Bam HI (q), Bgl II (r), Xho I und Acc I (s), Acc I (t), Acc I und Pst I (u). Als Größenmarker wurde lambda cI, geschnitten mit Hind III (a, k, l, v) verwendet.

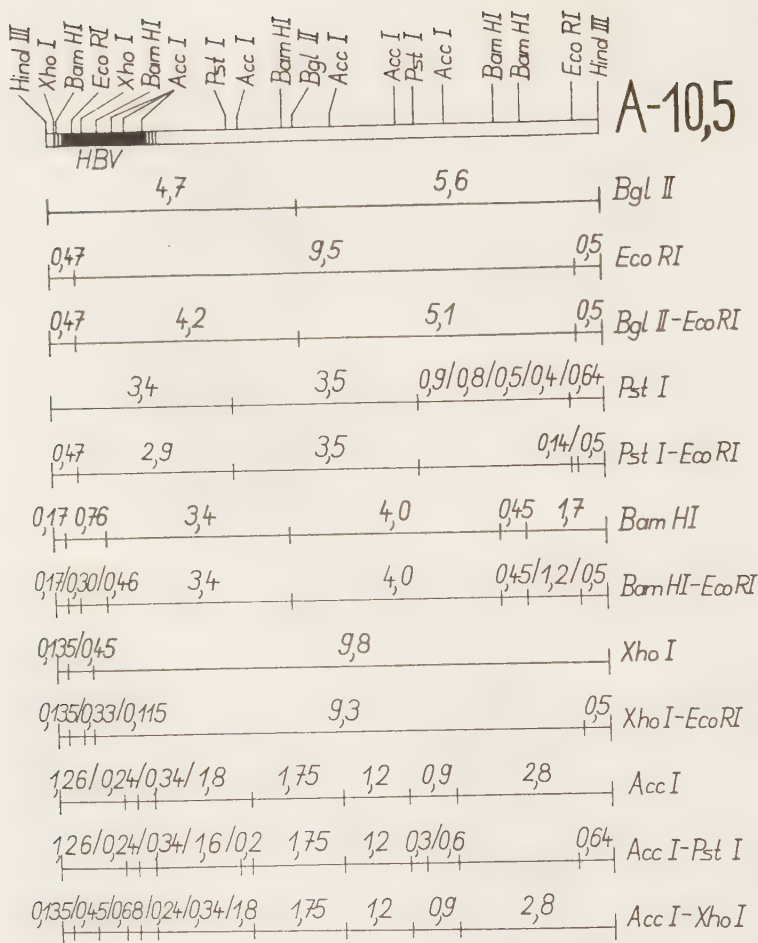


Abb. 11: Restriktionskarte von A-10,5

Die Größen der durch verschiedene Restriktionsenzyme entstehenden Subfragmente des Hind III-Fragments A-10,5 sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Aus diesen Daten ergibt sich die oben dargestellte Restriktionskarte, in welcher der mit HBV-DNA hybridisierende Teil fett gezeichnet ist. Da die Ausdehnung der HBV-DNA mit Hilfe der Southern Analyse nur grob bestimmt werden kann, sind die Bereiche schraffiert, in denen der Übergang zwischen viraler und humaner DNA liegen kann.

Da die 0,17 kb und 0,135 kb großen DNA-Stücke nicht mit HBV-DNA hybridisieren, muß zunächst angenommen werden, daß diese Fragmente humane DNA enthalten und der virale-humane Übergang zwischen der Eco RI- und der Bam HI-Stelle liegt, die der Hind III-Stelle am nächsten ist.

Durch Acc I entstehen HBV-DNA enthaltende Banden der Größe 1,8 kb, 1,26 kb, 0,34 kb und 0,24 kb (Abb. 10t, 11). Die 1,26 kb-Bande wird durch Xho I in 0,68 kb, 0,45 kb und 0,135 kb große Subfragmente zerlegt, muß also ein Acc I-Hind III-Fragment darstellen (Abb. 10s, 11). Da sich die 1,8 kb-Bande durch Pst I schneiden läßt, kann ihre Position ebenfalls festgelegt werden (Abb. 10u, 11). Die Hybridisierung des 1,8 kb-Fragments mit HBV-DNA ist verglichen mit dem Signal bei 1,26 kb schwach (Abb. 10t). Deshalb kann das 1,8 kb-Fragment nur wenig HBV-DNA enthalten. Der virale-humane Übergang muß folglich zwischen der Pst I- und der Acc I-Stelle, sehr nahe an der Acc I-Stelle, liegen.

3.4. Struktur der viralen DNA

Durch die Restriktionskartierung und die Hybridisierungsexperimente mit HBV-DNA konnten die Lage und die Anteile viraler DNA in den klonierten DNA-Fragmenten aus dem PLC/PRF/5-Genom bestimmt werden. Die HBV-DNA ist in Abbildung 7 jeweils als Balken dargestellt. Die Abbildung vermittelt den Eindruck, als könnte durch die beiden oben angegebenen Techniken bereits die exakte Ausdehnung der viralen DNA festgelegt werden. Tatsächlich kann nur festgestellt werden, daß die virale DNA zwischen zwei Restriktionsstellen endet. Erst die DNA-Sequenzierung, auf die später eingegangen wird, ermöglicht die Bestimmung der Integrationsstellen.

Aber bereits ein Vergleich der Restriktionskarten der klonierten Fragmente untereinander und mit den Karten

publizierter HBV-Genome läßt Aussagen über die in den Klonen vorhandenen viralen Bereiche machen. Die Kartierung von A-10,5 und A-10,7 ergibt, daß die Restriktionsstellen in den viralen Teilen identisch sind (Abb. 7a, b). Der HBV-Anteil von A-4,0 (Abb. 7d) ist den beiden sehr ähnlich. Die HBV-DNA in A-6,0 unterscheidet sich von den drei Klonen durch die Lage im Fragment - es liegt in der Mitte - und durch etwas andere Restriktionsstellen (Abb. 7c). Allen Klonen ist aber die Reihenfolge und die Distanz der Schnittstellen für Eco RI, Xho I, Bam HI und Acc I gemeinsam. Diese Konstellation findet sich bei den bekannten HBV-Genomen wieder (Abb. 2, 3), und zwar im Bereich der pre-s-Region und des HBs-Gens. Da nicht nur die Reihenfolge sondern auch die Abstände zwischen den Restriktionsstellen genau denen der HBV-Genome entsprechen, könnten auch die kodierenden Sequenzen von pre-s und HBs in den vier Klonen intakt vorliegen.

Virale Bereiche, die sich dem HBc-Gen zuordnen lassen, werden dagegen in A-4,0, A-10,5 und A-10,7 nicht gefunden. Auf das Fehlen des HBc-Gens weist auch der Befund hin, daß der HBV-Anteil in diesen Klonen rund 2 kb ausmacht, das vollständige virale Genom aber 3,2 kb umfaßt. Denkbar ist in diesen Fällen, daß die integrierte HBV-DNA eine Hind III-Stelle enthält, und der fehlende Bereich jenseits dieser Restriktionsstelle liegt. Ob die Sequenz zwischen der pre-s-Region und der "linken" Hind III-Stelle von A-4,0, A-10,5 und A-10,7 tatsächlich nur virale oder aber auch humane Sequenzen enthält, kann durch Restriktionskartierung und Hybridisierung nicht geklärt werden. Auch die genaue Lokalisierung der Übergänge zwischen viraler und humaner DNA auf der anderen Seite der integrierten HBV-DNA ist durch diese Methoden nicht bestimmbar.

A-6,0 enthält im Gegensatz zu den anderen drei Klonen noch einen weiteren Teil des viralen Genoms, nämlich den 5'-Bereich des HBc-Gens, was durch teilweise DNA-Sequenzierung (von Dr. R. Koshy und Dr. R. Kahmann durchgeführt)

nachgewiesen wurde. Wie aus Abbildung 7 zu sehen ist, enthält jedoch auch dieser Klon nicht HBV-DNA der vollen Länge von 3,2 kb. Da die virale DNA in diesem Fall eindeutig auf beiden Seiten von humaner DNA flankiert ist, muß die HBV-DNA in A-6,0 eine Deletion enthalten. Weil durch Restriktionsanalyse bzw. durch DNA-Sequenzierung das Vorhandensein des HBs-Gens, der pre-s-Region und des 5'-Teils des HBc-Gens nachgewiesen werden konnten, muß diese Deletion entweder im HBc-Gen oder im Bereich zwischen dem 3'-Ende des HBc-Gens und dem 5'-Ende der pre-s-Region liegen (Abb. 2). Die HBV-Genome haben in diesem Bereich zwei (Subtyp adr, adyw), drei (Subtyp ayw, adw₂; Abb. 2, 3) oder vier (Subtyp adw) Bgl II-Stellen. Bei A-6,0 ist aber nur eine vorhanden, was ebenfalls auf eine Deletion in diesem Bereich hinweist.

Weil die oben diskutierten Unklarheiten zur Struktur der HBV-DNA in den Klonen durch die bisher angewandten Methoden nicht beantwortet werden konnten, wurde zu ihrer Aufklärung die DNA-Sequenzierungstechnik (Maxam & Gilbert 1980) verwendet. Es sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Läßt sich die vermutete Deletion im HBc-Bereich von A-6,0 lokalisieren?
2. Besteht die Sequenz zwischen der viralen Eco RI-Stelle und der benachbarten Hind III-Stelle der Klone A-4,0, A-10,5 und A-10,7 aus viraler und humaner oder nur aus viraler DNA?
3. Wo liegt der Übergang zwischen viraler und humaner DNA auf der anderen Seite der integrierten HBV-DNA?

Alle in den folgenden Kapiteln angegebenen Sequenz-Positionen beziehen sich auf das Genom des HBV-Subtyps adw₂, wobei die einzige Eco RI-Stelle als Position 0 gewählt wurde (Abb.2, 3).

3.4.1. Deletion in A-6,0

Da die Deletion im Bereich um die Bgl II-Stelle (Abb. 7c) vermutet wurde, lag es nahe, von dieser Stelle ausgehend die DNA zu sequenzieren. Dazu wurde pA-6,0 mit Bgl II geschnitten, an den 5'-Enden mit ^{32}P markiert, mit Pst I nachgeschnitten und die beiden markierten Fragmente für die basenspezifischen Reaktionen eingesetzt. Durch den Vergleich der beiden Sequenzen mit denen der HBV-Genome konnte die Deletion lokalisiert werden. Außerdem erbrachte der Vergleich den Befund, daß A-6,0 nicht eine Bgl II-Stelle, sondern wie der HBV-Subtyp adw₂ zwei nur 24 bp voneinander entfernte Stellen besitzt (Position 2408 und 2432; Abb. 3, 12). Die Deletion liegt 23 Basen von der Bgl II-Stelle bei Position 2432 entfernt. Bis zu diesem Punkt ist die Sequenz von A-6,0 mit der entsprechenden HBV-Sequenz homolog (Abb. 12: 4. und 5. Sequenzzeile). Dann setzt sich die Basenfolge von A-6,0 in einer homologen, viralen Sequenz fort, die im HBV-Genom mit Position 2943 beginnt (Abb. 12: 3. und 4. Sequenzzeile). Durch die Sequenzierung konnte also die Ausdehnung der Deletion exakt bestimmt werden. Sie schließt die Positionen 2456 bis 2942 ein, ist also 487 bp groß.

3.4.2. Nachweis einer unerwarteten, viralen Hind III-Stelle in A-4,0, A-10,5 und A-10,7

Die drei klonierten DNA-Fragmente A-4,0, A-10,5 und A-10,7 wurden jeweils von der Hind III-Stelle aus sequenziert, die der viralen DNA am nächsten liegt (Abb. 7a, b, d; "linkes" Ende der Fragmente). Dabei wurde in jedem Fall mit Pst I nachgeschnitten. Bei A-10,7 wurde zusätzlich noch von der benachbarten Bam HI-Stelle in Richtung auf die Hind III-Stelle zu sequenziert. In allen drei Klonen erstreckt sich der virale Bereich bis zur Hind III-Stelle. Bei genauer Analyse dieser Hind III-Stelle ergibt sich, daß an dieser Stelle im HBV-Genom eine Sequenz vorhanden ist, aus der durch Mutation von zwei Basenpaaren eine

AACTACTGTTGTTAGACGACGAGACCGAGGCAGGTTCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGAAAG A-6.0
 |||||
 AACTACTGTTGTTAGACGACGGGACCGAGGCAGGTTCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCTCGCAGACGCAGATCTC 2413 HBV adw₂
 additional 6 bp Bgl II

 Deletion of bases
 2456 to 2942

 2901 CTTTCTGTTCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCGATCATCAATTGGACCCCTGCATTGGAGCCAACTCAAACAATCC HBV adw₂
 |||||
 CAATCTCGGGAATCTCAATTGGACCCAGCATTCGGAGCCAACTCAAACAATCC A-6.0
 |||||
 2414 CATCGCCGCGTCGCAGAGAATCTCAATCTCGGGAATCTCAATGTTAGTAT 2463 HBV adw₂

 Bgl II
 ProSerProArgArgArgArgSerGlnSerArgGluSerGlnCys*** HBV adw₂
 SerArgGluSerGlnPheGlyProSerIleArgSerGlnPheLysGlnSer A-6.0

Abb. 12: Deletion in A-6,0

Die Nukleotidsequenz von A-6,0 im Bereich der Bgl II-Stellen wird mit der HBV-DNA des Subtyps adw₂ verglichen. Für einen Teil dieser Region ist die entsprechende Aminosäuresequenz angegeben. Die Deletion erstreckt sich im HBV-Genom von Position 2456 bis 2942. In diesem Bereich liegt das Stop-Kodon des HBc-Gens (markiert durch drei Sterne). Für A-6,0 wird deshalb nach Translation des HBc-Gens ein verlängertes Protein erwartet. Die im Subtyp adw₂ zusätzlich auftretenden 6 Basenpaare (bp) sind gekennzeichnet.

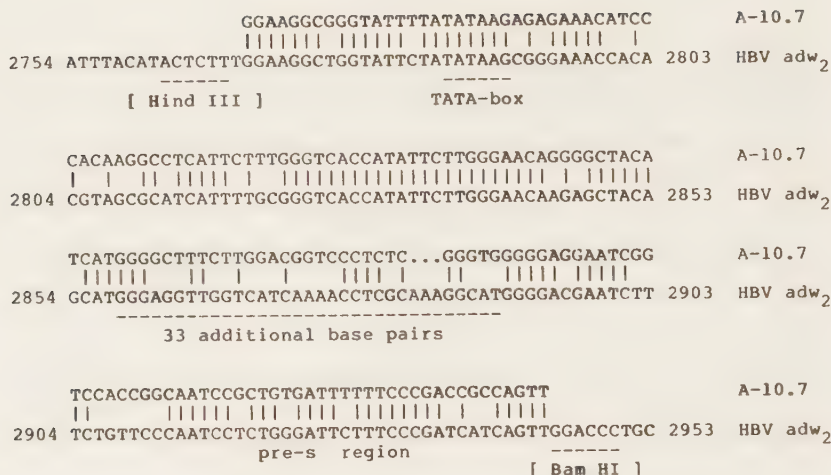


Abb. 13: Virale Hind III-Stelle in A-10,5 und A-10,7

Die Nukleotidsequenz von A-10,7, die von der, der HBV-DNA benachbarten Hind III-Stelle ausgeht, wird mit der DNA des HBV-Subtyps adw₂ verglichen. Die gezeigte Sequenz von A-10,7 ist identisch mit derjenigen von A-10,5. Die Sequenzhomologie reicht bis an die Hind III-Stelle heran. Das bedeutet, daß die integrierte HBV-DNA eine Hind III-Stelle hat, die durch Mutation von zwei Basenpaaren entstanden ist (Die in eckige Klammern gesetzten Restriktionsstellen kommen in A-10,7 und A-10,5, nicht aber in der HBV-DNA des Subtyps adw₂ vor). Die TATA-Box und die 33 im Subtyp adw₂ zusätzlichen Basenpaare, die am Anfang der pre-s-Region liegen, sind gekennzeichnet. A-10,7 und A-10,5 enthalten nur 30 dieser 33 Basenpaare.

		[Hind III]	
HBV	2770	CCAAAGAGTATGTAAATAATGTCTGGTTTGAAGTAATGATTAACCT	2721
A-4,0	1	CTTATGTAAATAGTGCCGAGATTGAAGTAATGATTACACAT	44
	2720	GATCTGGATAATAAGGTTTAAATTCCTTTGCTAAGGCCAAATATTTAGTG	2671
	45	GTTCAGGATAATAAGGCTTAATTCCTTCGTCTAGAGGCCAAATATTTAGTG	94
	2670	TGGGTAGGATAGAATCTAGCAGGCATAATTAATTTCAATCTTCTCTTTTC	2621
	95	GAGTTAGGATAAAACCTAGCAGGCATAATTAAGTTCANTCTTCGTTTTTC	144
	2620	ATTTACAGTGAGAGGGCCCAAAATTGTTGACACCTTATAATAATGTCT	2571
	145	ATTTACCGTGAGAGGGCCCAAAATTGTTGACACCTACCGGAGGTCTCT	192
		182	
HBV	3040	CATTGGGCCAAGGCTCACCCCTCCACAGCGCGGTATTTTGGGGTGGAGC	3089
A-4,0	156	GAGGGCCCAAAATTGTTGACACCTACCGGAGGTCTTTTGGGGTGGAGC	205
		182	
	3090	CCTCAGGCTCAGGCATATGTACACAGTCTCAACAATTCTCTCTCTGC	3139
	206	TCTCAGGCTCAAGGCACATTGCATACTGTGCCCGCAGTCTCTCTCTGC	255
	3140	CTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGGCAGCTACTCCATCTCTCCACCTC	3189
	256	CTCCACCAATCGGCAGACAGGAAGGCAGCTACTCCATCTCTCCACCTC	305
		SV40 ähnlicher Promotor	
	3190	TAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATGCAGTGG	3221
	306	TAAGAGACAGTCACCCCTCA	324

Abb. 14: Virale Hind III-Stelle in A-4,0

Die Nukleotidsequenz von A-4,0, die von der, der HBV-DNA benachbarten Hind III-Stelle ausgeht, wird mit der DNA des HBV-Subtyps adw₂ verglichen. Die Sequenzhomologie reicht bis an die Hind III-Stelle heran. Das bedeutet, daß die integrierte HBV-DNA eine Hind III-Stelle hat, die durch Mutation von zwei Basenpaaren entstanden ist (Die in eckige Klammern gesetzten Restriktionsstellen kommen in A-4,0, nicht aber in der HBV-DNA des Subtyps adw₂ vor). Allerdings stammen die ersten 181 sequenzierten Basen von A-4,0 aus dem HBV-Bereich der Position 2764 bis 2584, die folgenden Basen aber aus der Region 3066 bis 3207. Es wird deshalb eine Inversion vermutet, die den Bereich zwischen Position 2584 und 3066 erfaßt hat. Im sequenzierten Bereich liegt auch der HBs-Promotor, welcher dem späten Promotor des SV40 ähnlich ist.

Hind III-Stelle entstehen kann (Position 2763; Abb. 3, 13, 14). Das bedeutet, daß die HBV-DNA der Klone A-4,0, A-10,5 und A-10,7 eine unerwartete Hind III-Stelle besitzt. Das ist überraschend, weil alle bisher beschriebenen HBV-Genome keine Hind III-Stelle enthalten. Aufgrund dieser publizierten Daten war gerade dieses Enzym für die Klonierungsstrategie ausgewählt worden, die darauf abzielte, integrierte HBV-DNA und beide flankierenden, humanen DNA-Sequenzen zu klonieren.

Die fehlende Hybridisierung des Hind III-Bam HI-Fragments (Kapitel 3.3.2.), die zunächst auf einen viralen-humanen Übergang hinwies, muß nun anders erklärt werden. Offenbar enthält die für die Hybridisierung verwendete HBV-DNA aus pA01-HBV diesen Bereich nicht oder in einer veränderten Form. Da die HBV-DNA in pA01-HBV leider nicht sequenziert ist, muß diese Erklärung eine Vermutung bleiben.

Die im HBV-Teil der Restriktionskarten gleichen Fragmente A-10,5 und A-10,7 sind auch in der Sequenz in diesem Bereich gleich. Deutlich davon unterscheidet sich A-4,0. Während die Sequenz von A-10,5/A-10,7 "rechts" von der Hind III-Stelle liegt, stammt die Sequenz bei A-4,0 "links" von dieser Stelle. Nach 180 bp setzt sich die Sequenz aber dann in einem Bereich fort, der sich 304 bp "rechts" von der Hind III-Stelle befindet (Abb. 14). Das läßt sich durch eine Inversion erklären, die eine Region von Position 2583 bis 3066 umfaßt.

3.4.3. Bestimmung des HBV-Subtyps

Die HBV-Genome der Subtypen adr, adw, adw₂, adyw und ayw lassen sich am Vorhandensein von zusätzlichen Sequenzen an zwei bestimmten Stellen unterscheiden. Diese zusätzlichen Basen verändern die Leserahmen nicht, da sie immer als ein Vielfaches von drei vorkommen. Der Subtyp adw₂ (Valenzuela et al. 1980) enthält sechs zusätzliche Basen (Position

2356-2361), die im HBc-Gen liegen, und 33 zusätzliche Basen (Position 2858-2890) direkt am Anfang der pre-s-Region. Im Subtyp adw (Ono et al. 1983) kommt ebenfalls das 6 bp-Insert vor, aber von den 33 bp sind nur 12 bp vorhanden. Der Subtyp adr (Fujiyama et al. 1983; Ono et al. 1983) enthält nur das 33 bp-Insert, während den Subtypen ayw (Galibert et al. 1979) und adyw (Pasek et al. 1979) beide Sequenzen völlig fehlen.

Die HBV-DNA der Klone wird dem Subtyp adw₂ zugerechnet, weil in ihr das 6 bp- und das 33 bp-Insert vorliegen. Allerdings sind die beiden zusätzlichen Sequenzen nicht zusammen in einem Klon vorhanden, da keiner das gesamte virale Genom enthält. Die 6 bp wurden in A-6,0 durch DNA-Sequenzierung von der Bgl II-Stelle bei Position 2408 gefunden (Abb. 12). Das 33 bp-Insert fehlt diesem Klon, weil die entsprechende Region durch die 487 bp große Deletion erfaßt wurde. Bei A-10,5 und A-10,7 ist der Teil des HBV-Genoms, in dem die 6 bp liegen, nicht in den klonierten Fragmenten enthalten, da er jenseits der viralen Hind III-Stelle liegt. Jedoch sind 30 der 33 zusätzlichen Basenpaare in beiden Klonen an den erwarteten Stellen vorhanden (Abb. 13). Im Fragment A-4,0 fehlen die Bereiche, welche die beiden Sequenzen enthalten. Sie liegen außerhalb des klonierten Hind III-Fragments. Aber die Ähnlichkeit der Restriktionskarte des viralen Teils mit denen von A-10,5 und A-10,7 legt nahe, daß auch A-4,0 HBV-DNA des Subtyps adw₂ enthält. Diese Daten sind in guter Übereinstimmung mit dem Befund, daß im südlichen Afrika, wo die Zelllinie PLC/PRF/5 etabliert wurde, in 97,7% der HBsAg-positiven Seren HBV des Subtyps adw₂ vorkommt (Courouce-Pauty et al. 1983).

3.4.4. Bestimmung der viralen-humanen Übergänge

Die Lage der Übergänge zwischen viraler und humaner DNA war durch Hybridisierung der Restriktionsfragmente schon grob lokalisiert worden. Sie müssen bei A-10,5 und A-10,7

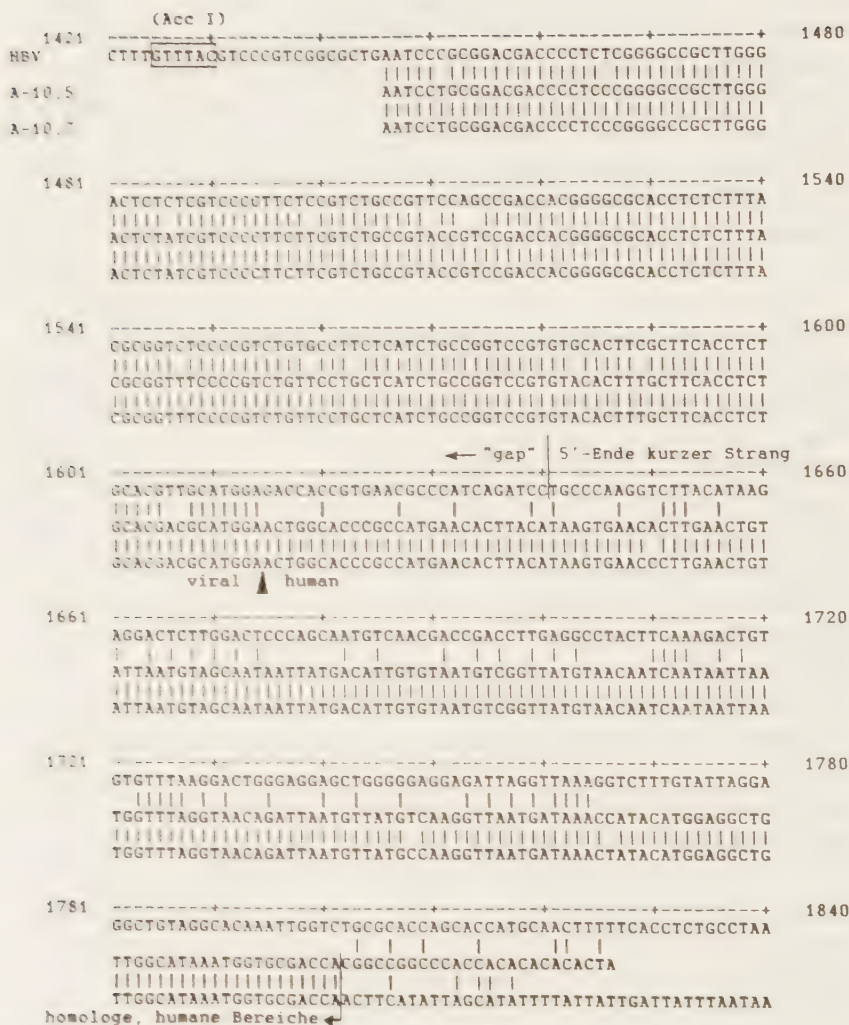


Abb. 15

Abb. 15: Bereich der viralen-humanen Übergänge in A-10,5 und A-10,7

Die Nukleotidsequenzen von A-10,5 und A-10,7, die - ausgehend von der viralen Acc I-Stelle - in die humane DNA reichen, werden untereinander und mit der DNA des HBV-Subtyps adw₂ verglichen. Der virale-humane Übergang liegt bei A-10,5 und A-10,7 an gleicher Stelle und auch 187 weitere, humane Basen sind bis auf drei Basen in beiden Klonen identisch. Die Integrationsstelle befindet sich in beiden Fällen im "gap", einem Bereich, der in der DNA des Virions einzelsträngig ist. Das 5'-Ende des kurzen Strangs ist entsprechend den Angaben von Delius et al. (1983) eingezeichnet.

Acc I
 A ATCTGCGGA CGACCCCTCC CGGGGCGGT

51 TGGGACTCTA TCGTCCCTT CTTCGTCTGC CGTACCGTCC GACCACGGGG

101 CGCACCTCTC TTACGCGGT TTCCCGTCT GTTCCTGCTC ATCTGCGGT

151 CCGTGATAC TTTGCTTAC CTCTGCACGA CGCATGGAAC TGGCACCCGC

201 CATGAACACT TACATAAGTG AACCCCTGAA CTGTATTAAAT GTAGCAATAA

251 TTATGACATT GTGTAATGTC GGTATGTAA CAATCAATAA TTAATGGTTT

301 AGCTAACAGA TTAATGTTAT GCCAAGGTTA ATGATAACT ATACATGGAG

351 GCTGTTGGCA TAAATGGTGC GACCAACTTC ATATTAGCAT ATTTTATTAT

401 TGATTATTATATAACACTT CAAAAGCCAA CAAGGAGGTT AATTITAGAA

451 ACCTCCTCCT CATAGTCAGT CCTTGACACA AGCAGACTCA GCTACATGGG

501 TTTGTTTCAA GAGTAAGTAA GACTAAGAGT AAGTCAGAGT TTGGAATTAT

551 TCTGTTTTGC TGTGGGCATA ATTCAATTCC AGTTTCCAAT CCCGTGTATT

601 TTTTAAACT GTCAATTGTA AATAAACAGG GACAACATAG TGATTGTAAA

651 GAGGAAGAAC CAGAACTTGA GITAATTGAA TTCTATCATT TTAATGTGAT

701 CACTTGGAAC TTTTATTTT GCITTAAGTT TAGAACTGTG AAGGATATTG

751 AGAAGGCACT TCCCACCCAC CGAGAGGCTC TAATCCAGAA GACTGACAAT

801 AACACGAGTT GGGGCGGATT TGGAGAAAGT TGAATCCTCC CACATTGCTG

851 GAGGGGGTGT AAAATAATGC AACCACITTG GAAAATAGTT TGGCGGTTCC

901 TTAAAACGTT AAGCAAAAT GTACCATATG GTCCAACCAT TCCACTCTTA

951 GGTATCCACC CAAGAGAAAT TAAACCCAC CCTTGAATC TCGCTCGGCG

1001 TTTGGGCATA TTGATTGTT AAGCAAGTCT CTAAATAAANC CCACACTTAA

1051 GGGGAAGGAAA ATTAAGCTCC GCCTCTTGAA GAGAGAGCA

Abb. 16: Expressionssignale in den, die HBV-DNA flankierenden, humanen Sequenzen von A-10,7

Die humane DNA, welche die integrierte HBV-DNA in A-10,7 flankiert, wurde von der viralen Acc I-Stelle und von der humanen Eco RI-Stelle aus sequenziert. Der virale-humane Übergang, die Leserahmen a, b, c, d und die Poly(A)-Signale sind eingezeichnet. Die viralen Leserahmen P und X reichen bis in die humanen Bereiche (a, b) und könnten Fusionsproteine ergeben. Dagegen ist der Leserahmen c nur human kodiert. Die in S1-Experimenten bestimmten Längen der mRNAs (Freytag von Loringhoven 1984), die zur Translation von HBsAg führen, korrelieren mit den eingezeichneten Poly(A)-Signalen bei Nukleotid 410, 621 und 1034. Das Poly(A)-Signal bei Nukleotid 717 könnte zur Prozessierung einer mRNA notwendig sein, die den humanen Leserahmen d enthält.

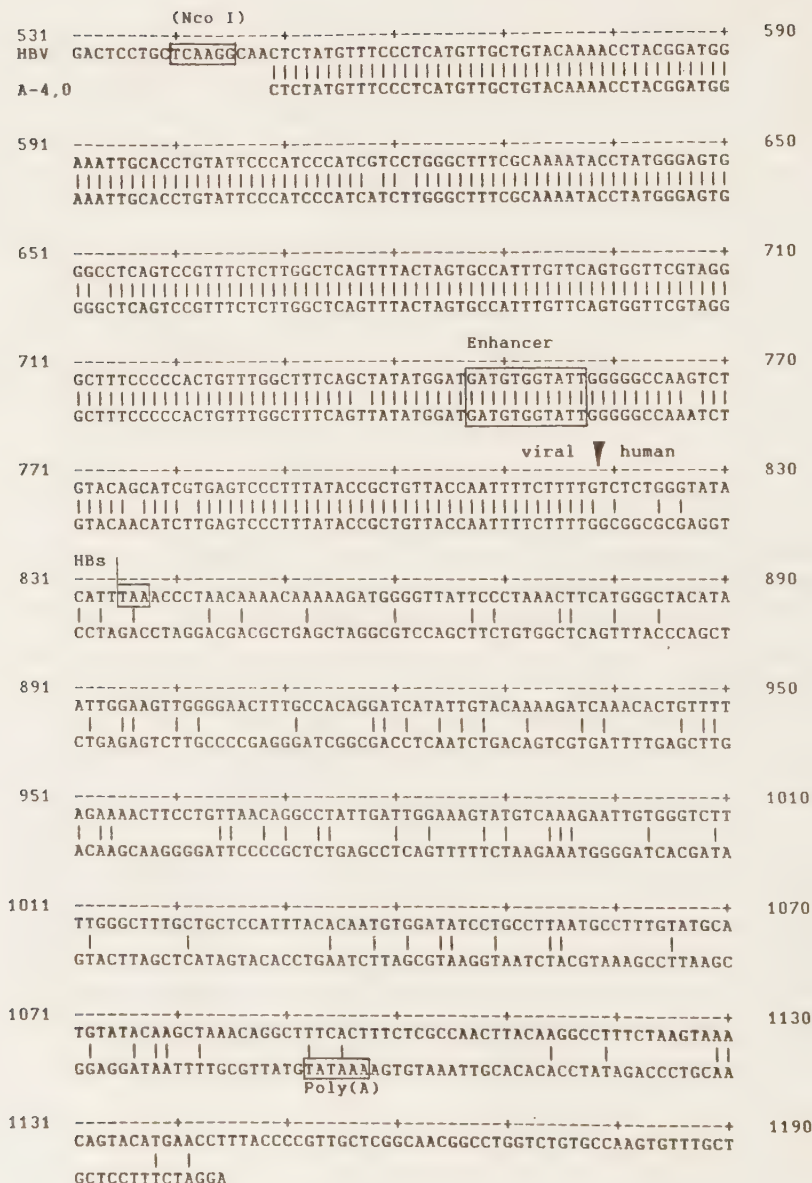
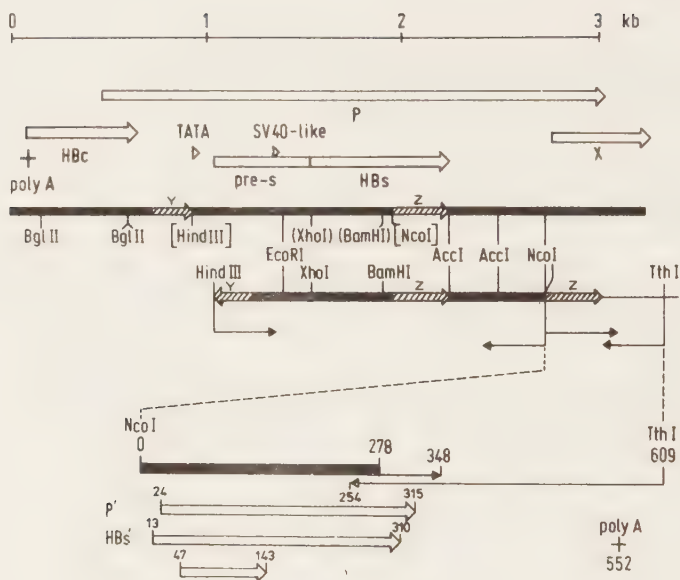


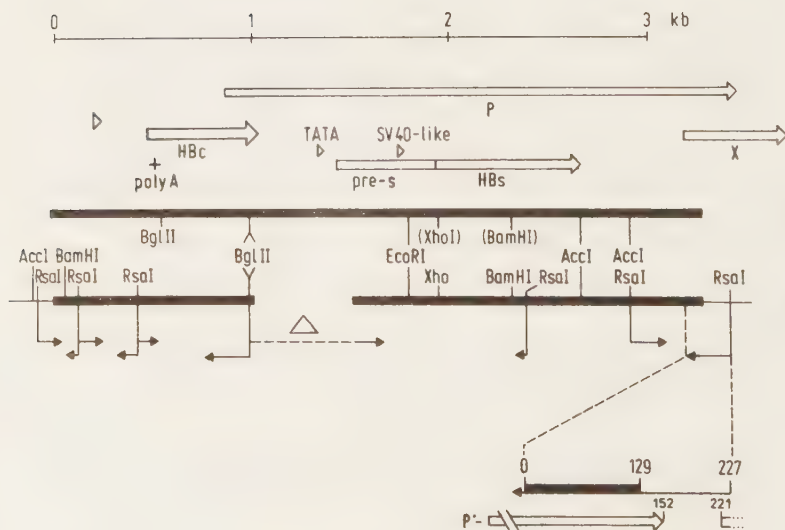
Abb. 17

Abb. 17: Bereich des viralen-humanen Übergangs in A-4,0

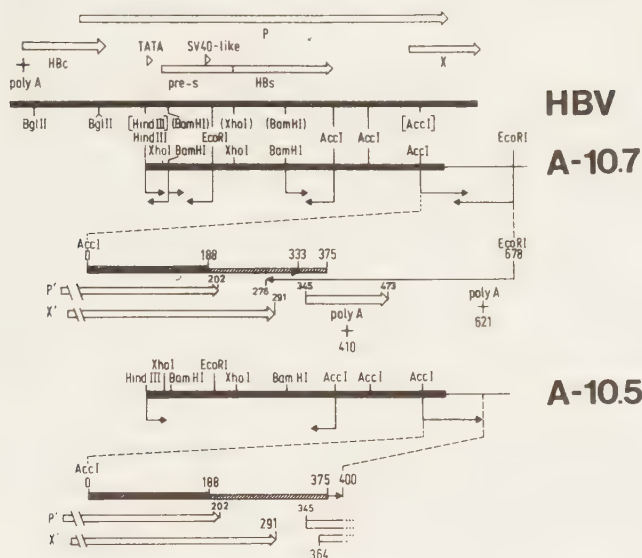
Die Nukleotidsequenz von A-4,0, die - ausgehend von der viralen Nco I-Stelle - in die humane DNA reicht, wird mit der DNA-Sequenz des HBV-Subtyps adw₂ verglichen. Die Integration erfolgte kurz vor dem 3'-Ende des HBs-Leserahmens. A-4,0 enthält eine Enhancer-Sequenz im HBV-Anteil und ein Poly(A)-Signal im humanen Bereich.



HBV
A-4.0



HBV
A-6.0



HBV
A-10.7

A-10.5

Abb. 18, 19, 20: Struktur der HBV-DNA und der humanen, flankierenden Sequenzen in den klonierten Fragmenten A-4,0 (Abb. 18), A-6,0 (Abb. 19), A-10,5 und A-10,7 (Abb. 20)

Das HBV-Genom des Subtyps adw₂ (Valenzuela et al. 1980) wird mit den viralen Sequenzen der klonierten Fragmente verglichen. Die fett gezeichneten Balken repräsentieren HBV-DNA, während die dünnen Linien humane DNA darstellen. Invertierte und duplizierte virale Anteile sind schraffiert. Getüpfelte Balken geben die Ausdehnung der Homologien zwischen der humanen DNA von A-10,5 und A-10,7 an. Die dünnen Pfeile markieren die sequenzierten Bereiche. Leserahmen sind als große, weiße Pfeile dargestellt. Sie sind punktiert gezeichnet, wenn sie in die unsequenzierte, humane DNA reichen. Diejenigen Leserahmen, welche mit P', X' und HBs' bezeichnet sind, sind in Phase mit den P-, X- oder HBs-Leserahmen. Die Polyadenylierungssignale sind als Kreuze, Promotoren (der HBC-Promotor, die HBs-TATA-Box und der SV40-ähnliche Promotor) als offene Pfeilspitzen gezeichnet. Die Restriktionsstellen in runden Klammern werden beim Subtyp ayw (Galibert et al. 1979) gefunden, die in eckigen Klammern können durch Basenmutationen erzeugt werden. Die Länge der vergrößerten DNA-Teile ist in Basenpaaren angegeben.

jenseits der dritten Acc I-Stelle; bei A-4,0 jenseits der Nco I-Stelle liegen. Sequenziert wurde deshalb ausgehend von diesen Stellen. Die Integrationsstellen bei A-6,0 waren bereits sequenziert worden (von Dr. R. Kahmann und Dr. R. Koshy).

Bei A-10,5 und A-10,7 ergab sich, daß in beiden Fällen die Integration auf viraler Ebene an genau dem gleichen Nukleotid, 188 bp von der Acc I-Stelle entfernt, stattgefunden hatte. Außerdem ist auch eine anschließende, humane Sequenz von 187 bp bis auf drei Basen in A-10,5 und A-10,7 identisch. Jenseits dieses Bereichs sind die humanen Sequenzen unterschiedlich (Abb. 15, 16). Dieses Phänomen wird in Kapitel 3.4.6. noch näher untersucht.

Bei A-4,0 liegt die Integrationsstelle 278 bp von der Nco I-Stelle entfernt. Auffällig ist, daß die Sequenz von der Nco I-Stelle bis zur Integrationsstelle nicht diejenige ist, die man auf Grund eines Vergleichs mit der Restriktionskarte der viralen DNA erwartet. Sie stammt nämlich aus dem Bereich des HBs-Gens (Position 540-818; Abb. 3, 17). Diese Region ist in A-4,0 verdoppelt. Sie kommt einmal an ihrer normalen Position und einmal zwischen der Nco I-Stelle und dem viralen-humanen Übergang vor. Die Sequenz auf der anderen Seite der Nco I-Stelle entspricht denen in den bekannten HBV-Genomen. Es ist denkbar, daß die Duplikation genau an der Nco I-Stelle inseriert wurde. Da aber in der normalen Sequenz direkt am Beginn der duplizierten Region eine potentielle Nco I-Stelle (Position 540) vorhanden ist, ist es eher wahrscheinlich, daß in A-4,0 zwei Nco I-Stellen sehr nahe benachbart liegen.

3.4.5. Restriktionskarten der integrierten HBV-DNA

Die Detailkarten des HBV-Anteils der Fragmente A-4,0 (Abb. 18), A-6,0 (Abb. 19), A-10,5 und A-10,7 (Abb. 20) fassen die Ergebnisse der Restriktionskartierung und der

DNA-Sequenzierung zusammen. Die wichtigsten Befunde, welche die Struktur der integrierten HBV-DNA betreffen, werden im Folgenden noch einmal zusammengefaßt.

1. Die Sequenzierung bestätigt, daß die integrierte HBV-DNA im Wesentlichen kolinear mit den bekannten HBV-Genomen ist. Ausnahmen stellen die Inversion und die Duplikation bei A-4,0 und die Deletion bei A-6,0 dar.
2. In drei von vier Fällen liegt unerwarteterweise eine virale Hind III-Stelle vor. Bei A-6,0 befindet sich die potentielle Hind III-Stelle im deletierten Bereich. Da für die Klonierung das Enzym Hind III gewählt wurde, enthält nur A-6,0 beide flankierenden, humanen Sequenzen.
3. Bei A-10,5 und A-10,7 ist der virale Anteil identisch. Zusätzlich sind bei beiden Klonen 187 bp der humanen Sequenzen, die die Integrationsstelle flankieren, bis auf drei Basen identisch.
4. Die Lage und die Sequenz der Integrationsstellen wird im Kapitel 3.5. detailliert dargestellt.
5. Die Sequenzierung ermöglicht die Beschreibung viraler und humaner Transkriptions- und Translationssignale, auf die im Kapitel 3.6. eingegangen wird.

3.4.6. Nachweis der Echtheit der Klone

Die DNA-Sequenzen der viralen-humanen Übergänge bei A-10,5 und A-10,7 zeigen, daß sowohl die Integrationsstellen wie auch die anschließenden humanen Sequenzen von 187 bp bis auf 3 Mutationen identisch sind. Um zu überprüfen, ob die beiden Klone wirklich Kopien von zwei unterschiedlichen, humanen Restriktionsfragmenten mit integrierter HBV-DNA und nicht Klonierungsartefakte darstellen, wurde das folgende Experiment ausgeführt. Die aus einem präparativen Gel eluierten, unklonierten Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA einer Größe von 11 kb (11 kb-DNA), aus deren Klonierung A-10,5 und A-10,7 hervorgingen, wurde mit geeigneten Enzymen geschnitten, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit ³²P-markierter HBV-DNA hybridisiert. Bei Inkubation mit

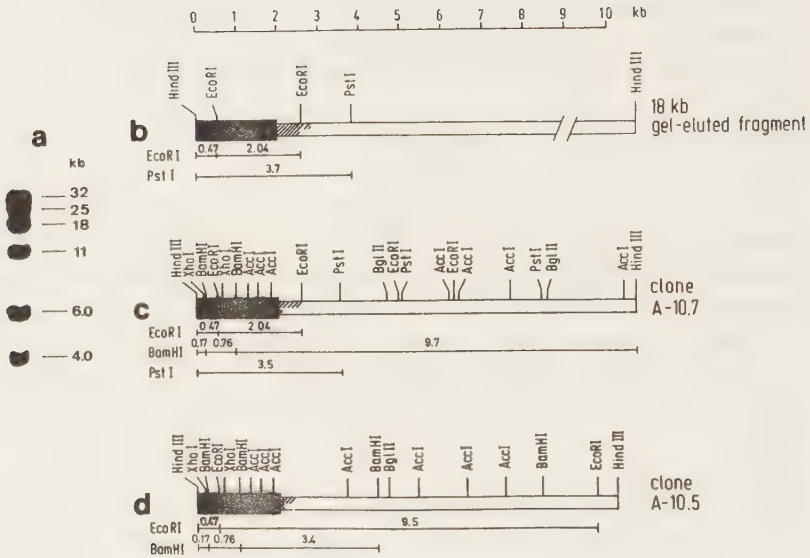


Abb. 21: Southern Analyse und Restriktionskarten der integrierten HBV-Sequenzen in der DNA der PLC/PRF/5-Zellen

Zelluläre PLC/PRF/5-DNA wurde mit Hind III geschnitten, in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert (a). In den Restriktionskarten des unklonierten, aus dem Gel eluierten 18 kb-Fragments (b), und der klonierten Fragmente A-10,7 (c) und A-10,5 (d), die beide von der 11 kb-Bande stammen, ist die humane, flankierende DNA als offener Balken und der HBV-Anteil als gefüllter Balken dargestellt. Die schraffierten Regionen repräsentieren humane Sequenzen, die in den Fragmenten homolog sind. Die Subfragmente, welche durch die Spaltung mit den angegebenen Enzymen entstehen und die mit HBV-DNA hybridisieren, sind unterhalb der Restriktionskarten gezeichnet. Die Längen sind in Kilobasenpaaren angegeben.

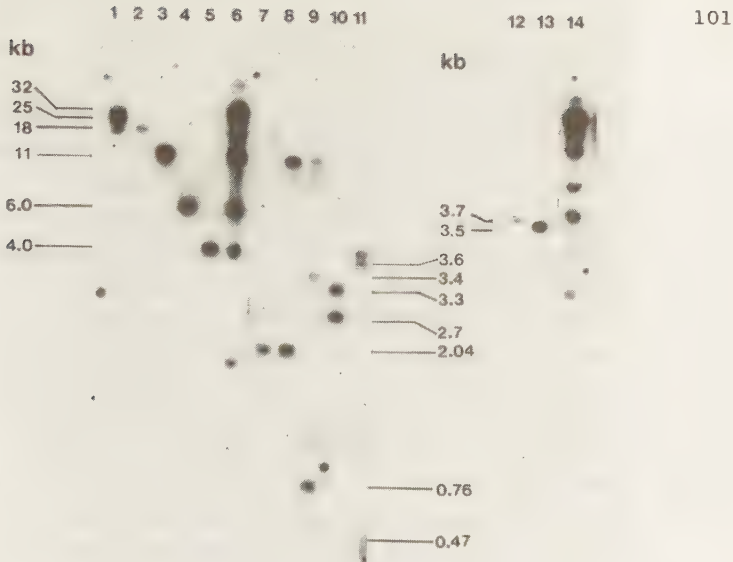


Abb. 22: Southern Analyse der HBV-DNA enthaltenden Fragmente, die aus der PLC/PRF/5-DNA durch den Schnitt mit Hind III entstehen

Die HBV-DNA enthaltenden Fragmente, die von einem präparativen Agarosegel mit Hind III-geschnittener PLC/PRF/5-DNA eluiert wurden, wurden entweder direkt oder nach Inkubation mit einem weiteren Restriktionsenzym auf ein analytisches 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Zum Vergleich wurde mit Hind III geschnittene PLC/PRF/5-DNA verwendet. Die DNA des Gels wurde für die Southern Analyse mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert. Spuren 6 und 14 zeigen PLC/PRF/5-DNA, geschnitten mit Hind III. Die anderen Spuren zeigen HBV-DNA enthaltende Fragmente der gleichen DNA, die von einem präparativen Agarosegel eluiert worden waren: 32 kb und 25 kb, kontaminiert mit 18 kb (Spur 1), 18 kb (Spur 2; geschnitten mit Eco RI: Spur 7; geschnitten mit Pst I: Spur 12), 11 kb (Spur 3; geschnitten mit Eco RI: Spur 8; geschnitten mit Bam HI: Spur 9; geschnitten mit Pst I: Spur 13), 6 kb (Spur 4; geschnitten mit Eco RI: Spur 10), 4 kb (Spur 5; geschnitten mit Eco RI: Spur 11).

Eco RI entstehen im Fall von A-10,7 hybridisierende Fragmente der Größe 2,04 kb und 0,47 kb (Abb. 21c), und im Fall von A-10,5 von 9,5 kb und 4,7 kb (Abb. 21d). Die Anwesenheit der 2,04 kb- und 0,47 kb-Banden (Abb. 22, Spur 8) beweist die Echtheit von A-10,7. Da die 9,5 kb-Bande, die für A-10,5 erwartet wird, nicht eindeutig von den ungeschnittenen Hind III-Fragmenten der Größe 10,5 kb und 10,7 kb unterscheidbar ist, wurde die 11 kb-DNA auch mit Bam HI inkubiert. Dieses Enzym soll HBV-DNA enthaltende Fragmente von 9,7 kb, 0,76 kb und 0,17 kb bei A-10,7 (Abb. 21c) und 3,4, 0,76 und 0,17 kb bei A-10,5 (Abb. 21d) ergeben. Der Fund einer 3,4 kb- und einer 0,76 kb-Bande (Abb. 22, Spur 9) zeigt, daß auch das dem A-10,5 entsprechenden Fragment in der unklonierten PLC/PRF/5-DNA vorkommt. Das 0,17 kb-Fragment hybridisiert aus Gründen, die schon im Kapitel 3.4.2. beschrieben wurden, nicht mit HBV-DNA.

Die beiden Fragmente A-10,5 und A-10,7 sind also echte Kopien von zwei unterschiedlichen Restriktionsfragmenten der PLC/PRF/5-DNA. Da deshalb das Vorhandensein der 187 bp langen, identischen, humanen Sequenzen ebenfalls kein Artefakt darstellen kann, muß dieser unerwartete Befund durch Vorgänge in den humanen Zellen erklärt werden. Denkbar ist, daß in beiden Fällen die Integration an identischen Stellen der HBV-DNA und der humanen DNA - innerhalb von repetitiven Sequenzen - erfolgte, was aber sehr unwahrscheinlich ist. Eine andere Möglichkeit besteht in der Amplifikation der integrierten HBV-DNA und der flankierenden, humanen Sequenzen.

Analog zu den oben genannten Experimenten wurde auch die Echtheit von A-4,0 und A-6,0 überprüft. Die Hybridisierung der Eco RI-geschnittenen 4 kb- und 6 kb-Fragmente ergab das erwartete Bandenmuster von 3,6 kb und 0,4 kb bei A-4,0 (Abb., 22, Spur 11; die 0,4-Bande ist schlecht zu sehen), und von 3,3 kb und 2,7 kb bei A-6,0 (Abb. 22, Spur 10).

3.4.7. Struktur der unklonierten Fragmente mit integrierter HBV-DNA

Gleichzeitig mit den in 3.4.6. geschilderten Experimenten wurden auch die anderen HBV-DNA enthaltenden Hind III-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA daraufhin untersucht, ob ihre Hybridisierungsmuster einen Rückschluß auf die Struktur der in ihnen integrierten HBV-DNA zulassen. Dabei wurde eine Ähnlichkeit zwischen A-10,7 und einem 18 kb großen, humanen Hind III-Fragment mit integrierter HBV-DNA deutlich. Die mit Eco RI geschnittene 18 kb-DNA weist nach Hybridisierung mit HBV-DNA Signale bei 2,04 kb und 0,47 kb (Abb. 21b, 22, Spur 7) auf, wie sie auch bei A-10,7 auftreten (Abb. 21c, 22, Spur 8). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß in A-10,7 und in dem 18 kb-Fragment identische Eco RI-Stellen vorhanden sind. Es wird deshalb eine Homologie zwischen diesen beiden Fragmenten vermutet, die sich mindestens von der viralen Hind III-Stelle bis zur ersten Eco RI-Stelle in der humanen, flankierenden DNA, aber offenbar nicht bis zur Pst I-Stelle in A-10,7 erstreckt. Denn das 3,5 kb große Hind III-Pst I-Subfragment in A-10,7 (Abb. 21c, 22, Spur 12) wird in der 18 kb-DNA nicht gefunden (Abb. 21b, 22, Spur 13).

Die DNA-Fragmente der Größe 25 kb und 32 kb konnten auf dem präparativen Agarosegel nicht voneinander getrennt werden. Außerdem war die eluierte DNA dieses Bereichs mit DNA des 18 kb-Fragments verunreinigt (Abb. 22, Spur 1). Deshalb wurden diese beiden Fragmente anhand der eluierten DNA nicht näher auf die Struktur der in ihnen enthaltenen HBV-Sequenzen untersucht.

Mit den geschilderten Experimenten konnte bisher eine Ähnlichkeit von drei humanen DNA-Fragmenten mit integrierter HBV-DNA festgestellt werden. Diese Ähnlichkeit äußert sich im Vorhandensein identischer HBV-Anteile und identischer, die virale DNA flankierender, humaner Sequenzen. Die humane DNA jenseits dieser identischen Sequenzen ist unterschied-

lich in den drei Fragmenten. Die Untersuchungen der Ähnlichkeit der Hind III-Fragmente beschränken sich aber wegen der viralen Hind III-Stelle nur auf einen Teil der integrierten HBV-DNA. Deshalb sollte durch Experimente mit der Gesamt-DNA des PLC/PRF/5-Genoms versucht werden, Hinweise auf die Struktur der viralen und humanen DNA jenseits der Hind III-Stelle und auf die Art der Integration in den Fragmenten der Größe 25-32 kb zu erhalten.

Zunächst werden die mit HBV-DNA hybridisierenden Eco RI-Fragmente der PLC/PRF/5-DNA interpretiert. Wie im Kapitel 3.1. beschrieben, wurden die starken Hybridisierungssignale bei 2,5 kb und 2,1 kb (Abb. 23, Spur e) als tandemartig integrierte HBV-Genome angesehen, die allerdings Deletionen enthalten müssen, da das vollständige Genom eine Länge von 3,2 kb hat. Da durch Hind III und Bgl II, welche beide in der HBV-DNA schneiden, die 2,5 kb und 2,1 kb großen Banden nicht verschwinden, scheint eine Deletion im viralen Genom vorzuliegen (Abb. 23, Spur b und f).

Wird aber die Ähnlichkeit der 10,7 kb und 18 kb großen Hind III-Fragmente berücksichtigt, kann die 2,1 kb-Bande auf das in beiden Fragmenten vorkommende 2,04 kb-Subfragment zurückzuführen sein. Die im Vergleich zu den anderen Hybridisierungssignalen auffallende Stärke des Signals bei 2,1 kb weist nämlich darauf hin, daß das DNA-Fragment dieser Größe nicht in nur einer, sondern in mehreren Kopien pro Zelle vorkommt. Die Vermutung, daß das starke Signal bei 2,1 kb auf die entsprechenden Eco RI-Fragmente von A-10,7 und des 18 kb-Hind III-Fragments zurückzuführen ist, wird durch die im Folgenden beschriebenen Experimente erhärtet. Wird die PLC/PRF/5-DNA gleichzeitig mit Nco I und Eco RI geschnitten, so wird nach Hybridisierung mit markierter HBV-DNA ein auffallend starkes Signal bei 1,4 kb sichtbar (Abb. 23, Spur d). Nco I schneidet an einer bestimmten Stelle in allen bekannten HBV-Genomen und auch in den HBV-Anteilen der klonierten Fragmenten A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7. Das 1,4 kb-Signal entspricht genau dem

erwarteten Abstand zwischen der viralen Eco RI- und Nco I-Stelle (Abb. 24). Bestünde das 2,1 kb große Eco RI-Fragment, welches das 1,4 kb-Fragment enthält, nur aus viraler DNA in Tandemanordnung, müßte zusätzlich zu dem 1,4 kb-Signal auch ein ähnlich starkes 0,7 kb-Signal auftreten. Da das nicht der Fall ist (Abb. 23, Spur d), muß die DNA jenseits der Nco I-Stelle zum größten Teil aus humaner DNA bestehen, wie es für A-10,7 nachgewiesen ist und für das 18 kb große Hind III-Fragment erwartet wird. Deshalb ist das 2,1 kb-Signal nicht ein Hinweis auf tandemartige Integration, sondern darauf, daß die Integration von HBV-DNA an einer bestimmten Stelle des humanen Genoms der PLC/PRF/5-Zellen mehrmals vorkommt.

Auch das 2,5 kb große Eco RI-Fragment besteht mit großer Wahrscheinlichkeit aus viraler und humaner DNA. Denn auch die 2,5 kb-Bande wird durch Nco I geschnitten und ein in diesem Fall zusätzlich entstehendes 1,1 kb großes Nco I-Eco RI-Fragment, oder auch Bruchstücke davon, hybridisieren nicht mit HBV-DNA. Ein relativ schwaches Signal bei 2,5 kb bleibt beim Schnitt mit Nco I vorhanden (Abb. 23, Spur d). Da diese Bande etwas höher liegt als die starke Schwärzung, die in diesem Bereich beim Schnitt mit Eco RI auftritt, handelt es sich aber um ein völlig anderes Fragment, das nur zufällig fast gleich groß ist. Das Auftreten der stark mit HBV-DNA hybridisierenden, 2,5 kb großen Bande weist, wie auch das starke Signal bei 2,1 kb, darauf hin, daß HBV-DNA entweder spezifisch integriert, oder ein Integrat durch Amplifikation in mehreren Kopien im PLC/PRF/5-Genom vorliegt.

Das auffallend starke Hybridisierungssignal eines 1,4 kb großen Eco RI-Nco I-Fragments mit HBV-DNA ergibt noch einen weiteren Hinweis zur Struktur der integrierten viralen DNA. Da die beiden Restriktionsstellen Eco RI und Nco I das HBs-Gen einschließen (Abb. 24), liegt in allen viralen Integraten dieses Gen ohne nachweisbare Veränderungen, wie große Deletionen oder Insertionen, vor. Auf das Fehlen von

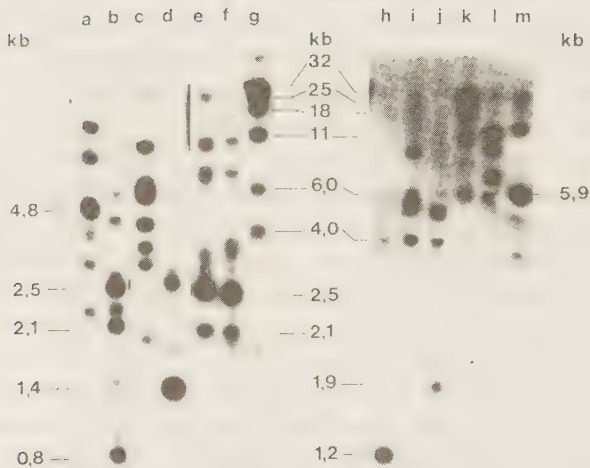


Abb. 23: Southern Analyse von PLC/PRF/5-DNA mit verschiedenen Enzymen

DNA der PLC/PRF/5-Zellen wurde mit verschiedenen Enzymen geschnitten, in 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit ^{32}P -markierter HBV-DNA hybridisiert. Die Spuren zeigen PLC/PRF/5-DNA, geschnitten mit Bgl II (a), Bgl II und Eco RI (b), Nco I (c), Nco I und Eco RI (d), Eco RI (e), Eco RI und Hind III (f), Hind III (g), Nco I und Xho I (h), Nco I (i), Nco I und Hind III (k), Pst I (l), Tth I (m).

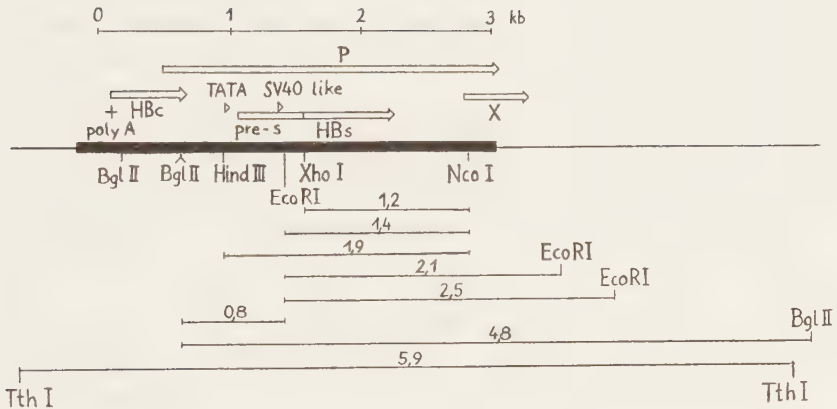


Abb. 24: Schematische Darstellung der integrierten HBV-DNA im Genom der PLC/PRF/5-Zellen

Im oberen Teil der Abbildung sind der Größenmaßstab, die viralen Leserahmen Hbc, pre-s, HBs, P und X, das Polyadenylierungssignal und die Promotoren des HBs-Gens zu sehen. Darunter ist ein Ausschnitt aus der PLC/PRF/5-DNA gezeichnet. Dabei ist die humane DNA als dünne Linie, die HBV-DNA, für die einige Restriktionsstellen angegeben sind, als dicke Linie dargestellt. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die besonders stark mit HBV-DNA hybridisierenden Restriktionsfragmente der PLC/PRF/5-DNA. Die Zeichnung stellt eine Interpretation der auffallend starken Hybridisierungssignale dar, die in Abbildung 23 zu sehen sind.

solchen Rearrangements im HBs-Gen weist auch das Auftreten von HBV-DNA enthaltenden 1,2 kb großen Nco I-Xho I- (Abb. 23, Spur h) und 1,9 kb großen Nco I-Hind III-Fragmenten hin (Abb. 23, Spur i), die ebenfalls das HBs-Gen enthalten. Beide Fragmente werden entsprechend den publizierten HBV-Genomen oder im Fall des Nco I-Hind III-Fragments aus der Restriktionskartierung der klonierten Fragmente erwartet. Allerdings ist das 1,9 kb große Nco I-Hind III-Signal schwächer als das 1,4 kb große bei Nco I-Eco RI und das 1,2 kb große bei Nco I-Xho I. Das weist darauf hin, daß bei einigen Integraten der Bereich um die virale Hind III-Stelle entweder fehlt, oder verändert ist, was für die Klone A-6,0 und A-4,0 bereits gezeigt werden konnte (Abb. 18, 19).

Aus den Experimenten mit der Gesamt-DNA der PLC/PRF/5-Zellen können auch Hinweise dafür erhalten werden, daß Sequenzen des HBc-Bereichs vorhanden sind. Dieser Bereich würde bei den Klonen A-10,5 und A-10,7 "jenseits" der viralen Hind III-Stelle liegen. Im Bereich des HBc können je nach HBV-Subtyp 2-4 Bgl II-Stellen auftreten (Kapitel 3.4.). Durch die Analyse der vier klonierten Hind III-Fragmente kann die Anzahl der bei dieser Viruspopulation in diesem Genombereich vorhandenen Bgl II-Stellen nicht ermittelt werden. Denn nur eines dieser Fragmente enthält überhaupt die HBc-Region, und diese wurde durch eine Deletion verändert. Wird jedoch die Ähnlichkeit der integrierten HBV-DNA mit der des Subtyps adw₂ berücksichtigt, läßt das Auftreten eines mit HBV-DNA hybridisierenden 0,8 kb großen Bgl II-Eco RI-Fragments (Abb. 23, Spur b) auf das Vorhandensein des beim Subtyp adw₂ erwarteten, viralen DNA-Fragments aus der HBc-Region schließen (Abb. 24). Die Stärke des Signals weist darauf hin, daß dieses Fragment in mehreren HBV-Integraten vorhanden ist. Ob das HBc-Gen selbst ohne Rearrangements vorliegt, läßt sich wegen des Fehlens geeigneter Restriktionsstellen nicht untersuchen.

Bei Inkubation mit Bgl II allein tritt eine stark

hybridisierende 4,8 kb große Bande auf (Abb. 23, Spur a), die wegen ihrer Größe aus viraler und humaner DNA bestehen muß. Dieses Fragment wird mit Eco RI gespalten und ergibt die ebenfalls stark mit HBV-DNA hybridisierenden Subfragmente der Größe 0,8 kb, 2,1 kb, und 2,5 kb (Abb. 23, Spur b; Abb. 24). Das Auftreten der stark hybridisierenden 4,8 kb-Bgl II-Bande muß im Bezug auf gleiche humane, flankierende Sequenzen in allen, HBV-DNA enthaltenden Fragmenten dieser Größe vorsichtig interpretiert werden, da sich in diesem Größenbereich offenbar mehrere mit HBV-DNA hybridisierende Banden befinden. So liegen die von der Kartierung von A-10,5 und A-10,7 erwarteten Bgl II-Fragmente mit 5,0 kb ebenfalls in diesem Bereich. Für diese beiden Klone ist aber bekannt, daß zwar gleiche humane, flankierende Sequenzen vorhanden sind, die aber nicht bis zu den Bgl II-Stellen reichen. Ähnlich vorsichtig muß ein auffallend starkes Hybridisierungssignal von 5,9 kb Größe interpretiert werden, das beim Schnitt der PLC/PRF/5-DNA mit Tth I entsteht (Abb. 23, Spur m). Da dieses Enzym in keinem der publizierten HBV-Genome und auch nicht in den klonierten PLC/PRF/5-Fragmenten in der HBV-DNA schneidet, könnte angenommen werden, daß mehrere virale Integrate auf beiden Seiten die gleichen humanen DNA-Sequenzen tragen (Abb. 24).

Schnitte mit Nco I bzw. Pst I ergeben dagegen mehrere, verschieden große Banden gleicher Intensität (Abb. 23, Spur c und l). Da Pst I nicht innerhalb der HBV-DNA schneidet, müssen beide, die HBV-Integrate flankierenden Schnittstellen außerhalb derjenigen humanen Sequenzen liegen, die bei mehreren Integraten gleich sind. Da Nco I einmal im HBV-Anteil schneidet, muß der zweite Schnitt des HBV-DNA enthaltenden Fragments ebenfalls außerhalb dieser gleichen humanen Sequenzen liegen.

Aus der Southern Analyse der mit Nco I bzw. Pst I geschnittenen PLC/PRF/5-DNA läßt sich außerdem noch die Anzahl der integrierten HBV-DNA-Kopien abschätzen. Da Nco I einmal in der HBV-DNA schneidet, werden eigentlich doppelt

so viele Banden erwartet, wie nach Restriktion mit dem Enzym Pst I, das keine Erkennungsstelle innerhalb des HBV-Genoms hat. Wie jedoch bereits oben gezeigt wurde, ist ein Integrationsort in unmittelbarer Nachbarschaft der Nco I-Stelle, so daß pro Integrat nur jeweils eines der virale und humane DNA enthaltenden Fragmente durch Hybridisierung mit HBV-DNA nachweisbar ist. Da nach Verdau mit Nco I bzw. Pst I mindestens sieben Banden auftreten (Abb. 23, Spur c und l), sollten ebenso viele HBV-Integrate vorhanden sein.

3.5. Integrationsstellen

Im Bezug auf die Integrationsstellen sind folgende Fragen von Interesse:

1. Erfolgt die Integration spezifisch oder völlig zufällig in viralen und humanen Sequenzen?
2. Ist die Integration mit Verdopplung flankierender Sequenzen verbunden, wie sie bei Retroviren (Hughes et al. 1981) gefunden wird?
3. Gibt die Lage der Integrationsstellen Hinweise darauf, ob die terminalen Duplikationen, die beim Aufschmelzen der "nick-gap-Struktur" des viralen Genoms entstehen, bei der Integration eine Rolle spielen?

3.5.1. Sequenzen an den Integrationsstellen

Die Sequenzen an den Integrationsstellen von A-4,0, A-6,0 und A-10,5/A-10,7 sind in Abbildung 25 dargestellt. Ein Vergleich der viralen-humanen Übergänge untereinander ergibt keine auffälligen Ähnlichkeiten. Die Integration scheint also weder auf humaner noch auf viraler Ebene an einer genau definierten Stelle zu erfolgen. Bei A-6,0 ist das virale Genom von "inverted repeats" AAA bzw. TTT (Abb. 25, eingerahmte Sequenz) flankiert. An der Integrationsstelle selbst sind 9 virale Basenpaare deletiert. Ob vergleichbare

strukturelle Eigenheiten auch bei A-4,0, A-10,5 und A-10,7 vorliegen, läßt sich wegen des Fehlens jeweils einer der humanen, flankierenden Sequenzen nicht sagen.

Eine Gemeinsamkeit haben aber die verschiedenen Integrationsstellen: Sie liegen alle im "gap" (Abb. 26), einem Bereich, der bei 99% aller DNA-Moleküle aus Dane-Partikeln einzelsträngig ist (Deliuss et al. 1983). Das deutet auf eine mögliche funktionelle Rolle dieses Bereichs bei der Integration hin. Die den retroviralen LTRs ähnlichen terminalen Duplikationen haben dagegen offenbar keine Bedeutung, denn in diesem Fall würde sich die HBV-DNA zwischen dem Ende des HBs-Gens und dem Anfang des HBc-Gens öffnen. Die vor dem HBc-Gen liegenden Sequenzen erstrecken sich dabei bis etwa Position 1650 (bis zum 5'-Ende des kurzen Stranges), die nach dem HBs-Gen liegenden bis etwa Position 1850 (bis zum 5'-Ende des langen Stranges). Der Bereich zwischen 1650 und 1850 ist an den Integrationsstellen doppelt vorhanden. Im Insert A-6,0, das beide Integrationsstellen enthält, findet sich keine Verdopplung dieses Bereichs. Die tatsächlichen Integrationsorte liegen bei A-4,0 1,0 kb, bei A-6,0 0,25 kb bzw. 0,45 kb, bei A-10,5 und A-10,7 0,25 kb von den postulierten Stellen entfernt.

3.5.2. Homologien zwischen viralen und humanen Sequenzen

Das vorausgegangene Kapitel zeigt, daß die humanen Sequenzen direkt an den Integrationsstellen keine Ähnlichkeit miteinander oder mit viralen Sequenzen aufweisen, wie es bei Rekombination von SV40-DNA mit zellulären Sequenzen gezeigt werden konnte (Gutai & Nathans 1978, Stringer 1981). Vielleicht liegen aber Homologien in weiter entfernten Regionen. Um dies zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Computerprogrammen die humanen, flankierenden Bereiche untereinander und mit dem gesamten HBV-Genom verglichen. Diese Analyse erbrachte Homologien zwischen humanen, flankierenden Sequenzen der Klone "rechts" von der

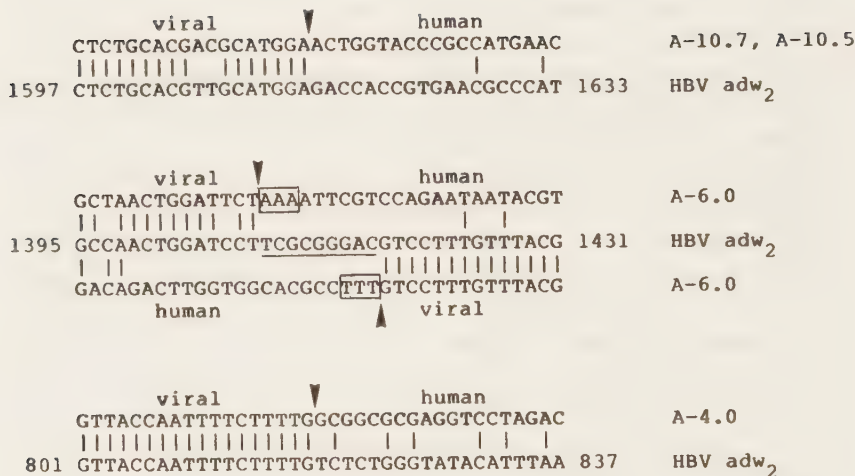


Abb. 25: Nukleotidsequenz der Integrationsstellen

Die viralen-humanen Übergänge in den Klonen A-10,7/A-10,5, A-6,0 und A-4,0 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die "inverted repeats" bei A-6,0, "AAA" und "TTT", an beiden Seiten der integrierten HBV-DNA, sind eingerahmt und die neun Basenpaare, die an der Integrationsstelle fehlen, sind unterstrichen. Die Basen in der HBV-DNA sind wie bei den Abbildungen 2 und 3 nummeriert.

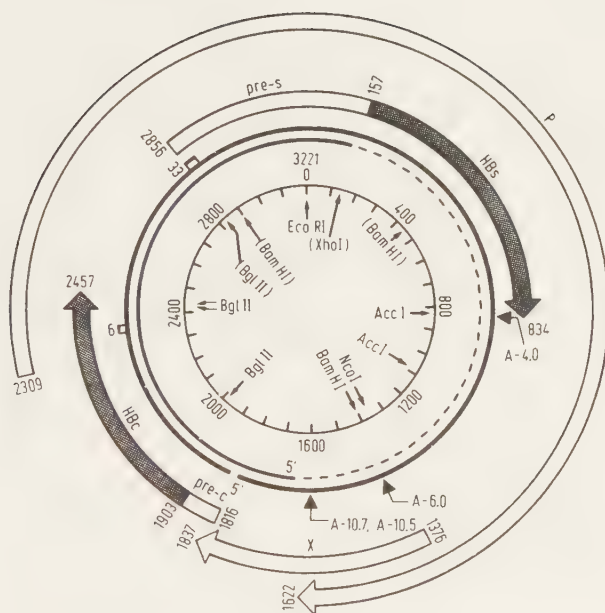


Abb. 26: Zirkuläre Karte der HBV-DNA des Subtyps adw_2 und Integrationsstellen bei A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7. Die Abbildung ist identisch mit Abbildung 2. Zusätzlich ist die Lage der Integrationsstellen in der HBV-DNA eingezeichnet, die bei den klonierten Fragmenten A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 gefunden wurden.

HBV-DNA in Abbildung 7 und HBV-DNA in der Nähe der betreffenden Integrationsstellen und zwar immer in einem Bereich, der in Abbildung 26 im Uhrzeigersinn links von der jeweiligen Integrationsstelle liegt. Die Größe der Homologien variiert von 10 bis 13 bp und ihr Abstand von den Übergangsstellen beträgt 10 bis 61 bp in der humanen DNA und 131 bis 636 bp in der viralen DNA (Tab. 2). Um die Häufigkeit solcher Homologien abzuschätzen, wurden die Sequenzen mit der Nukleinsäure-Datenbank der National Biomedical Research Foundation (Georgetown University, Washington, D.C.) verglichen. In dieser Datenbank, die 1,3 Millionen Basen enthält, finden sich die homologen Sequenzen ohne "mismatch" nur in den HBV-Sequenzen.

Tabelle 2: Sequenzhomologien zwischen
zellulärer und viraler DNA

Klon	Entfernung von der Integrationsstelle (bp)		Homologe Sequenz
	viral	zellulär	
A-4.0	134	53	TGGCTCAGTTTAC
A-6.0	636	10	CCAAGTCTGT
A-10.7	574	61	TTACACAATGT
A-10.5			

3.5.3. Integrationsstellen im humanen Genom

Die unterschiedlichen Restriktionskarten der flankierenden, humanen Sequenzen lassen vermuten, daß auch die Integrationsbereiche in der humanen DNA verschieden sind, was durch Hybridisierungsexperimente bestätigt wurde. Die

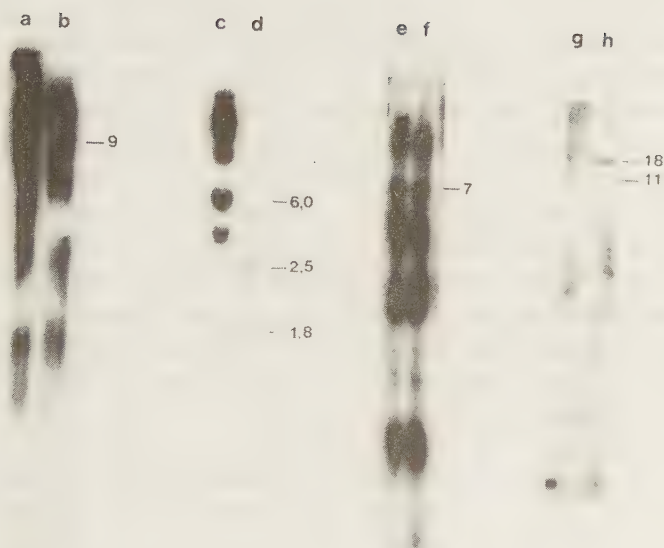


Abb. 27: Bereiche der Integration im humanen Genom

Zur Hybridisierung mit Hind III-geschnittener DNA aus PLC/PRF/5-Zellen (a, c, e, g) und HBV-DNA freier, humaner Zellen (b, d, f, h) wurden die aus der PLC/PRF/5-DNA klonierten Hind III-Fragmente A-4,0 (a, b) A-6,0 (c, d), A-10,5 (e, f) und A-10,7 (g, h) mit ^{32}P markiert und in der Southern Analyse eingesetzt. Da bei Hybridisierung mit A-4,0 und A-10,5 neben distinkten Banden (Größenangaben in Kilobasenpaaren) starke Hybridisierungen mit anderen Bereichen auftreten, enthalten diese Klone repetitive DNA.

humanen Bereiche hybridisieren nicht miteinander (Autoradiographie nicht gezeigt). Auch bei Hybridisierung der klonierten Fragmente gegen Hind III-geschnittene, HBV-DNA-freie, humane DNA zeigen sich Unterschiede. Da HBV-DNA allein nicht mit humaner DNA hybridisiert, wurden die Experimente mit den gesamten, klonierten Hind III-Fragmenten durchgeführt. A-4,0 hybridisiert mit einer Bande von 9 kb (Abb. 27b), A-6,0 mit Banden von 1,8 und 2,5 kb (Abb. 27d), A-10,5 mit einer 7 kb-Bande (Abb. 27f) und A-10,7 mit einer 18 kb-Bande (Abb. 27h). Bei Hybridisierung mit A-4,0 und A-10,5 treten in der Autoradiographie der mit Hind III geschnittenen humanen DNA zusätzlich Schwärzungen auf, wie sie auch bei Hybridisierung mit repetitiver DNA gefunden werden. Das deutet auf einen Gehalt an repetitiver DNA in diesen beiden Klonen hin.

Da A-6,0 beide flankierenden, humanen Bereiche enthält, läßt sich untersuchen, ob bei der Integration von HBV-DNA strukturelle Veränderungen in der humanen DNA erfolgten. Weil bei der Hybridisierung von A-6,0 mit Hind III-geschnittener, HBV-DNA-freier, humaner DNA zwei Banden an Stelle der erwarteten einen auftreten, muß bei der Integration der HBV-DNA eine Hind III-Stelle in der humanen DNA verloren gegangen sein. Der humane Anteil in A-6,0 beträgt 3,4 kb. Die beiden hybridisierenden Banden von 1,8 und 2,5 kb (Abb. 27d) ergeben zusammen aber 4,3 kb. Die Differenz von 0,9 kb läßt sich durch eine, vermutlich mit der Integration in Verbindung stehende Deletion humaner DNA erklären.

3.6. Transkription und Translation der klonierten Fragmente

Die Restriktionskarte der klonierten Fragmente lieferte starke Hinweise darauf, daß das HBs-Gen in allen Fällen intakt ist (Kapitel 3.4.). Ein Beweis dafür könnte durch DNA-Sequenzierung erhalten werden. Einfacher ist es jedoch, die biologische Aktivität dieser DNA an der Expression von HBsAg mit Hilfe eines Radioimmuntests nachzuweisen.

Zusätzlich sollten diese Daten unter Berücksichtigung der Sequenzanalyse der Übergänge zwischen viraler und humaner DNA eine Aussage darüber erlauben, ob im PLC/PRF/5-Genom die humane DNA in einer funktionellen Beziehung zur integrierten HBV-DNA steht. Eine solche Beziehung könnte z.B. darin bestehen, daß die Expression humaner Gene durch einen viralen Promotor stimuliert wird.

Zunächst werden für jedes der klonierten Fragmente die für die Expression von Genen wichtigen Sequenzsignale dargestellt, wie sie sich aus den Daten der Restriktionskartierung und der DNA-Sequenzierung ergeben. Die genaue Lage und Funktion der Signale für die HBsAg- und HBcAg-Expression ist in Kapitel 1.3.1. beschrieben. Die Effekte der für die Expression dieser viralen Proteine notwendigen Signale wurden in Ltk-Zellen untersucht, die mit den klonierten DNA-Fragmenten transfiziert worden waren.

3.6.1. HBs-Gen

3.6.1.1. Expressionssignale

In A-10,5 und A-10,7 sind beide HBs-Promotoren, die TATA-Box und die dem späten SV40-Promotor ähnliche Sequenz vorhanden (Abb. 13, 20). Auch die pre-s-Region und das HBs-Gen sollten intakt vorliegen. Bei den anderen beiden Klonen fehlt die TATA-Box. In A-4,0 ist sie von der Inversion (Abb. 18) betroffen und deshalb nicht im klonierten Fragment enthalten. Der SV40-ähnliche Promotor ist vorhanden (Abb. 17, 18). Bei A-6,0 wurde die TATA-Box durch die Deletion (Abb. 19) erfaßt. Allen vier Klonen ist gemeinsam, daß das virale Polyadenylierungssignal (TATAAA, eine Variation der in vielen anderen Fällen erkannten Sequenz AATAAA), das im HBc-Gen liegt, durch die Integration der HBV-DNA vom HBs-Gen getrennt ist. Ein solches Signal, das für die Prozessierung der mRNA notwendig ist, muß also von der humanen DNA geliefert werden. In den humanen

Bereichen von A-10,7 (Abb. 16, 20) und A-4,0 (Abb. 17, 18) konnten durch Sequenzierung solche Signale (AATAAA) festgestellt werden.

3.6.1.2. Ergebnisse im Ltk-System

Die klonierten DNA-Fragmente wurden zusammen mit tk-DNA (Thymidinkinase-Gen von Herpes simplex Virus) in Ltk-Zellen eingeschleust. Nur Ltk-Zellen, die tk-DNA aufgenommen haben, können in einem Medium wachsen, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium). Die anderen Zellen sterben ab. Da die HBV-DNA enthaltenden Fragmente in großem Überschuß gegenüber der tk-DNA vorhanden waren, sollten alle tk-positiven Zellen auch die klonierten Fragmente enthalten. Nach Bildung von tk-positiven Zellklonen wurde das Medium in einem Radioimmuntest auf HBsAg geprüft (AUSRIA, Firma Abbott). Die Experimente mit A-4,0, A-10,5 und A-10,7 zeigten positive Ergebnisse, während bei A-6,0 keine HBs-Expression gemessen werden konnte.

3.6.1.3. Diskussion der HBsAg-Expression

A-4,0, A-10,5 und A-10,7 führen zur Expression von HBsAg. Da in A-4,0 nur der SV40-ähnliche Promotor, nicht aber die TATA-Box vorhanden ist, muß im Ltk-System der SV40-ähnliche Promotor bevorzugt erkannt werden. Es konnte durch S1-Kartierung der mRNA gezeigt werden, daß auch bei A-10,7 die Transkription von diesem Promotor ausgeht (Freytag von Loringhoven 1984). Da A-10,5 mit A-10,7 im HBV-Teil identisch ist, muß das auch für diesen Klon gelten. Der Befund, daß der SV40-ähnliche Promotor der bevorzugt verwendete ist (Cattaneo et al. 1983), konnte damit bestätigt werden.

Der Verlust der TATA-Box bei A-6,0 erklärt deshalb nicht die fehlende Expression. Entweder liegt im Gen selbst eine

Mutation, oder der humane Bereich stellt kein entsprechendes Polyadenylierungssignal zur Verfügung. Bei A-4,0, A-10,5 und A-10,7 reichen die HBs-Transkripte wegen des fehlenden viralen Signals bis in die humane DNA. Bei A-10,7 konnte das durch S1-Kartierung der mRNA eindeutig bewiesen werden (Freytag von Loringhoven 1984).

3.6.2. HBc-Gen

3.6.2.1. Expressionssignale und Ergebnisse im Ltk-System

Bei A-4,0, A-10,5 und A-10,7 liegt der Bereich des HBc-Gens jenseits der viralen Hind III-Stelle und ist deshalb nicht in den Klonen enthalten. Nur A-6,0 enthält Sequenzen des HBc-Gens. Der vermutliche HBc-Promotor (TACATAAG, Position 1653-1660; Valenzuela et al. 1980, Rall et al. 1983) liegt nach den Daten der Restriktionskartierung im Klon. Auch der kodierende Bereich ist mit Ausnahme des Stop-Kodons vorhanden, das von der Deletion erfaßt wurde, die vom HBc-Gen bis in die pre-s-Region reicht. In diesem Bereich überlappen die Leserahmen der pre-s- und der P-Region (Abb. 19). Die beiden viralen Bereiche sind in A-6,0 so verbunden, daß der Leserahmen des HBc-Gens in den der P-Region übergeht (Abb. 12). Deshalb würde das HBcAg in diesem Fall um mindestens 47 Aminosäuren (soweit reicht der sequenzierte Bereich) verlängert sein.

Nach Transfektion von A-6,0 in Ltk-Zellen konnte mit Hilfe eines Radioimmuntests (Abbott-HBe; dieser Test erfaßt HBeAg und HBcAg) keine HBcAg-Expression festgestellt werden (Freytag von Loringhoven 1984). Das Fehlen der HBcAg-Expression kann verschiedene Ursachen haben. Die einfachste Erklärung liegt in einer Mutation innerhalb des Gens. Aber die fehlende Expression könnte auch ein Regulationsphänomen darstellen. So kann die HBcAg-Expression durch Methylierung unterdrückt sein (Yoakum et al. 1983). Eine Unterdrückung der Expression wird offenbar erst unter besonderen

Bedingungen aufgehoben. Sie kann in PLC/PRF/5-Zellen durch Kokultivierung dieser Zellen in nackten Mäusen induziert werden (Marquardt et al. 1984 a). Gough (1983) gibt Hinweise darauf, daß in der unintegrierten HBV-DNA eine mRNA, die von einem der HBs-Promotoren ausgeht und sowohl das HBs- wie das HBc-Gen enthält, für die HBcAg-Expression verantwortlich ist. Bei A-6,0 ist die HBV-DNA aber so integriert, daß die Transkription, beginnend von einem HBs-Promotor, nie zu einer mRNA führen kann, die das HBc-Gen mit einschließt. Denkbar ist allerdings auch, daß die HBcAg-Expression tatsächlich vorhanden ist, aber nicht nachgewiesen werden kann, weil das dabei entstehende lange Fusionsprotein, das C-terminal die Aminosäuresequenz des P-Gens enthält, nicht gut mit dem Anti-HBe im Radioimmunist reagiert.

3.6.3. Expressionssignale in den humanen Sequenzen

In allen vier Klonen liegt die Integrationsstelle so, daß das virale Polyadenylierungssignal, das für die Prozessierung der Transkripte notwendig ist, abgetrennt ist. Deshalb muß die HBs-mRNA bis an Signale in der humanen DNA reichen und folglich sowohl virale als auch humane Information enthalten. Computeranalysen der betreffenden humanen Sequenzen ergeben bei A-4,0 und A-10,7 das Vorhandensein von Polyadenylierungssignalen, die 274 bp (Abb. 17, 18) bzw. 222 bp, 433 bp und 846 bp (Abb. 16, 20) vom viralen-humanen Übergang entfernt sind. Bei A-10,5 (Abb. 20) und A-6,0 (Abb. 19) sind in den sequenzierten Bereichen keine solchen Signale vorhanden.

In allen Fällen werden Leserahmen gefunden, die virale und humane Information enthalten. Sie könnten Fusionsproteine ergeben, bei denen der virale Anteil überwiegt. Diese Leserahmen sind bei A-6,0 (Abb. 19), A-10,5 und A-10,7 (Abb. 20) diejenigen der hypothetischen P- und X-Proteine. Der Teil an C-terminalen Aminosäuren, die von humaner DNA kodiert sind, variiert von 5 bis 34 Aminosäuren. Bei A-4,0

beginnen zwei Leserahmen an Start-Kodons innerhalb der P- und HBs-Gene (Abb. 18). Die hypothetischen Fusionsproteine würden 12 oder 10 C-terminale, human-kodierte Aminosäuren enthalten. Ein dritter, kleiner Leserahmen liegt innerhalb der HBV-DNA. Er wird auch in den bekannten, sequenzierten HBV-Genomen gefunden. Der P-Leserahmen "links" der Nco I-Stelle bei Position 1374 ist in Phase mit einem dieser drei, vorausgesetzt, daß kein Stop-Kodon zwischen den zwei oben erwähnten Nco I-Stellen vorhanden ist (Kapitel 3.4.4.).

In A-10,5 (Abb. 20) und A-6,0 (Abb. 19) befinden sich Startpunkte für hypothetische, rein humane Leserahmen, deren Ausdehnung nicht bestimmt werden konnte, weil ihre Enden jenseits der sequenzierten Bereiche liegen. Bei A-10,7 gibt es auch einen rein humanen Leserahmen, der tatsächlich transkribiert wird, da viele mRNA-Transkripte das zweite Polyadenylierungssignal (Abb. 16, 20, Nukleotid 621) erreichen. Das konnte durch S1-Kartierung der mRNA gezeigt werden (Freytag von Loringhoven 1984).

Weiter entfernt liegende, humane Leserahmen könnten von einem viralen Enhancer stimuliert werden, dessen Sequenz im HBs-Gen gefunden wird. Die bei verschiedenen Viren (Adenovirus, SV40, Bovine-Papilloma-Virus, Polyoma-Virus, Murine-Sarkoma-Virus) gefundenen Enhancer (Hen et al. 1983) haben die übereinstimmende Sequenz GNTGTGGQQQ (N = A, C, G, T; Q = A, T). Dieser Enhancer ist in der HBV-DNA der Klone A-4,0 (Abb. 17), A-10,5 und A-10,7 durch DNA-Sequenzierung nachgewiesen. In A-6,0 sollte er nach den Daten der Restriktionsanalyse ebenfalls vorhanden sein.

3.7. Onkogene Eigenschaften der klonierten Fragmente

3.7.1. Transfektion von NIH3T3-Zellen

Es konnte in diesem Labor bereits gezeigt werden, daß PLC/PRF/5-DNA transformierende Eigenschaften hat (Koshy, unveröffentlichte Daten). Für diese Experimente wurde die NIH3T3-Zelllinie verwendet. Diese Mausfibroblast-Zelllinie kann durch geeignete Onkogene, wie z.B. durch ras oder mos maligne transformiert werden. Die transformierten NIH3T3-Zellen wachsen nicht mehr als Monolayer, sondern ohne Kontaktinhibition übereinander. Diese Zellanhäufungen werden als Foci bezeichnet. Transformierte Zellen zeigen auch ein verändertes Aussehen. Sie haben spindelförmige Gestalt, die Zellränder sind unter dem Mikroskop gut zu erkennen, während bei untransformierten Zellen die Zellgrenzen kaum sichtbar sind.

Für die Onkogenese wird ein "multistep process" postuliert, d.h. nicht ein einziger, sondern erst mehrere Schritte führen zur malignen Transformation einer Zelle. Damit im NIH3T3-System die Wirkung von Onkogenen nachweisbar ist, müssen diese Zellen bereits so weit verändert sein, daß nur noch ein "Schritt" nötig ist, um die Zellen endgültig zu transformieren.

Da die transformierende Wirkung von PLC/PRF/5-DNA auf NIH3T3-Zellen bekannt war, sollte untersucht werden, ob diese onkogene Potenz in einem der aus dem PLC/PRF/5-Genom klonierten DNA-Fragmente liegt. Dazu wurden die in pBR327 klonierten DNA-Fragmente A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 zusammen mit Kalbsthymus-DNA in NIH3T3-Zellen transfiziert. An Plasmid-DNA wurden dabei 5 bis 10 µg eingesetzt. Als positive Kontrollen wurden 50 ng bzw. 500 ng DNA der klonierten, viralen Onkogene Ha-ras (H-1), src (pSRA-2) und fms (pfms) verwendet. In jeden Ansatz wurde soviel Kalbsthymus-DNA gegeben, daß insgesamt 20 µg DNA vorhanden war. Für die negativen Kontrollen wurde Kalbsthymus-DNA

(KT-DNA) allein verwendet oder überhaupt keine DNA zu den Zellen gegeben. Diese Kontrollen sind wichtig, da in jedem Experiment auch die Anzahl der spontan transformierten Zellen bestimmt werden muß. Die Anzahl der bei diesen Experimenten erhaltenen Foci ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Bildung von Foci nach Transfektion
in NIH3T3-Zellen

Eingesetzte DNA	ug	Foci nach 17 Tagen	Foci nach 22 Tagen	Anzahl der transformierten Zellen nach Passage
H-1	0,05	8	30	
pSRA-2	0,5	2	11	
pfms	0,5	1	9	
ohne DNA		0	0	
nur KT-DNA		0	0	
pA-4,0	5	1	3	1
pA-6,0	5	1	3	1
pA-10,5	10	1	2	1
pA-10,7	10	0	2	0

Die Zellen der Foci aus den Experimenten mit pA-4,0, pA-6,0, pA-10,5 und pA-10,7 wurden mit Hilfe von Klonierungszylindern isoliert und in kleinen Kulturflaschen ausgesät. Nur in einem Teil der Flaschen waren weiterhin Zellen mit der veränderten Wachstumsmorphologie zu sehen (Tab. 3).

Wird die Größe der verwendeten Plasmide, die eingesetzte DNA-Menge und die Anzahl der Foci berücksichtigt, läßt sich die Effizienz der Transformation abschätzen. Im Vergleich zu pSRA-2 und pfms bzw. H-1 ist die Transformationsrate von

pA-4,0, pA-6,0, pA-10,5 und pA-10,7 um den Faktor 20 bzw. 1000 niedriger. Sie liegt knapp über den Spontan-Werten. Die humanen DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA haben deshalb entweder kein onkogenes Potential, oder ein eventuell vorhandenes Onkogen zeigt im NIH3T3-System keine transformierende Wirkung. Deshalb muß untersucht werden, ob die Klone zelluläre Onkogene enthalten, die zwar die NIH3T3-Zellen keinen Effekt zeigen, aber für die Transformation der PLC/PRF/5-Zellen eine Bedeutung haben könnten.

3.7.2. Suche nach bekannten Onkogenen

Die flankierenden, humanen Sequenzen der PLC/PRF/5-Klone könnten zelluläre Onkogene tragen, deren Stimulierung durch die integrierte HBV-DNA bei der Onkogenese eine Rolle spielen könnte. Dieser Frage wurde durch die folgenden Experimente nachgegangen.

Plasmide, die verschiedene, virale Onkogene (abl, erb, fes, fms, Ha-ras, Ki-ras, myb, myc, sis, src, yes; Kapitel 2.1.4.) enthalten, wurden so mit Restriktionsenzymen geschnitten, daß das klonierte Insert vom Vektor getrennt ist. Diese DNA wurde zur Southern Analyse auf Nitrozellulosefilter übertragen und mit den isolierten, radioaktiv markierten DNA-Fragmenten A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 hybridisiert. Nur mit A-10,5 war ein deutliches Signal mit dem das v-myc enthaltenden Plasmids pMCO (Dalla Favera et al. 1982) sichtbar (Autoradiographie nicht gezeigt).

Zur Lokalisierung des hybridisierenden Bereichs in A-10,5 wurde die DNA von pA-10,5 mit verschiedenen Enzymen geschnitten und mit dem aus pMCO isolierten, radioaktiv markierten Insert hybridisiert (Abb. 28). Das mit Hind III geschnittene pA-10,5 ergibt im Gegensatz zu pA-4,0, pA-6,0 und pA-10,7 schwache, aber deutlich positive Signale und zwar von 10,5 kb und 7 kb Größe. Das 7 kb-Fragment ist auf



Abb. 28: Lokalisierung des mit pMCO hybridisierenden Bereichs von A-10,5

Fragmente der Plasmide pA-4,0, pA-6,0, pA-10,5 und pA-10,7 wurden mit dem isolierten, ^{32}P -markierten Insert des Plasmids pMCO, das v-myc und gag enthält, hybridisiert. Da das isolierte pMCO-Insert Verunreinigungen mit pBR327-DNA aufweist, hybridisieren auch die Plasmidfragmente der Klone. Zusätzlich dazu sind bei pA-10,5 Hind III-Banden von 10,5 kb und 7 kb (c), eine 3,4 kb große Hind III-Bam HI-Bande (g), eine 3,4 kb große Hind III-Pst I-Bande (h) und eine 1,8 kb große Acc I-Bande (i) positiv. Die Spuren zeigen die Plasmide pA-4,0 (geschnitten mit Hind III: a), pA-6,0 (geschnitten mit Hind III: b; geschnitten mit Hind III und Bam HI: e; geschnitten mit Hind III und Acc I: f), pA-10,5 (geschnitten mit Hind III: c; geschnitten mit Hind III und Bam HI: g; geschnitten mit Hind III und Pst I: h; geschnitten mit Hind III und Acc I: i) und pA-10,7 (geschnitten mit Hind III: d; geschnitten mit Hind III und Eco RI: j; geschnitten mit Hind III und Pst I: k).

eine Deletion im pA-10,5 zurückzuführen, die bei der Replikation des Plasmids in Bakterien mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit immer wieder auftritt. Die Ursache dafür wurde nicht weiter untersucht. Die genannte Deletion liegt im humanen Teil des klonierten Inserts, rund 5 kb von der HBV-DNA entfernt, und stört die weiteren Betrachtungen nicht.

pA-10,5 wurde zusätzlich zu Hind III mit weiteren Enzymen geschnitten, um den hybridisierenden Bereich einzuengen. Beim Schnitt mit Pst I ist ein 3,4 kb großes Fragment positiv, mit Acc I ein 1,8 kb großes und mit Bam HI ein 3,4 kb großes (Abb. 28). Diese Fragmente enthalten Sequenzen humaner und viraler DNA (Abb. 11). Da HBV-DNA nicht mit pMCO hybridisiert (A-4,0, A-6,0 und A-10,7 enthalten HBV-DNA, sind aber in der Hybridisierung negativ), muß der zu pMCO homologe Bereich in A-10,5 also direkt neben der integrierten HBV-DNA liegen.

Das aus pMCO isolierte Insert enthält außer dem v-myc auch die gag-Region des retroviralen Provirus. Um unterscheiden zu können, auf welche Sequenz die Hybridisierung zurückzuführen ist, wurde das klonierte, humane myc-Gen (pCMYC; Battey et al. 1983) für die Hybridisierung verwendet. Das zur Verfügung stehende Plasmid pCMYC enthält Exon 2 und 3. Da Exon 1 nicht transkribiert wird und im v-myc (pMCO) auch nur die zu Exon 2 und 3 homologen Sequenzen enthalten sind, ist die Hybridisierung mit pCMYC ausreichend zum Nachweis von myc-Sequenzen.

Im Intron zwischen Exon 2 und 3 liegt repetitive DNA (Battey et al. 1983), welche die Auswertung des Hybridisierungsexperiments stört. Deshalb wurden von pCMYC ein 1,4 kb großes Sac I-Fragment und ein 1,5 kb großes Cla I-Eco RI-Fragment isoliert, das nur die Exons 2 bzw. 3, nicht aber die repetitive DNA enthält (Abb. 29). Beide Fragmente wurden mit ^{32}P markiert und getrennt zur Hybridisierung von DNA-Fragmenten des Plasmids pA-10,5 eingesetzt. Das Exon 2

zeigte das gleiche Verhalten wie pMCO (Abb. 28), d.h. es hybridisiert schwach, aber deutlich positiv mit A-10,5. Dagegen ließ sich mit Exon 3 keine Hybridisierung feststellen.

Entweder ist eine Kreuzhybridisierung mit einer dem myc-Gen entfernt verwandten Sequenz für das positive Signal verantwortlich, oder in A-10,5 ist nur ein kleiner Teil des myc-Gens, etwa 100 bp, vorhanden. Da die hybridisierenden Sequenzen in der Nähe der HBV-DNA liegen, ist eine Integration der viralen DNA in das Exon 2 denkbar. Weil Exon 3 nicht in A-10,5 enthalten ist, sollte die Integration so erfolgt sein, daß nur Exon 1 und ein kleiner Teil von Exon 2 in A-10,5 liegen. Wird A-10,5 mit dem, diesen Vorstellungen entsprechenden Bereich von c-myc verglichen (Abb. 29), fällt jedoch auf, daß die Restriktionskarten starke Unterschiede aufweisen, was obiger Annahme nicht entspricht. Dies könnte allerdings wiederum auf Rearrangements im 5'-Bereich des c-myc zurückzuführen sein.

Es ist deshalb notwendig, zu untersuchen, ob die Struktur des c-myc im Genom der PLC/PRF/5-Zellen verändert ist oder nicht. Für diese Experimente wurde PLC/PRF/5-DNA und DNA aus HBV-freien, humanen Zellen mit Hind III, Eco RI und Pst I geschnitten und mit Exon 2 (dem 1,4 kb großen Sac I-Fragment aus pCMYC) hybridisiert. Für das normale, humane c-myc werden beim Verdau mit Pst I hybridisierende Fragmente der Größen 5,5 kb, 2,7 kb und 0,4 kb erwartet, mit Hind III der Größe 12 kb und mit Eco RI der Größe 13 kb (Abb. 29). Rearrangements oder die Integration von DNA in diesem Bereich müßte zu auffälligen Veränderungen der Fragmentgrößen führen. In diesem Fall würden neben den normalen, hybridisierenden Fragmenten, die vom intakten, allelen Chromosom stammen, zusätzliche Banden erwartet.

Da die Hybridisierungssignale von Exon 2 mit geschnittener PLC/PRF/5-DNA und HBV-freier, humaner DNA gleich sind (Abb. 30), sind keine solchen Veränderungen vorhanden. Das

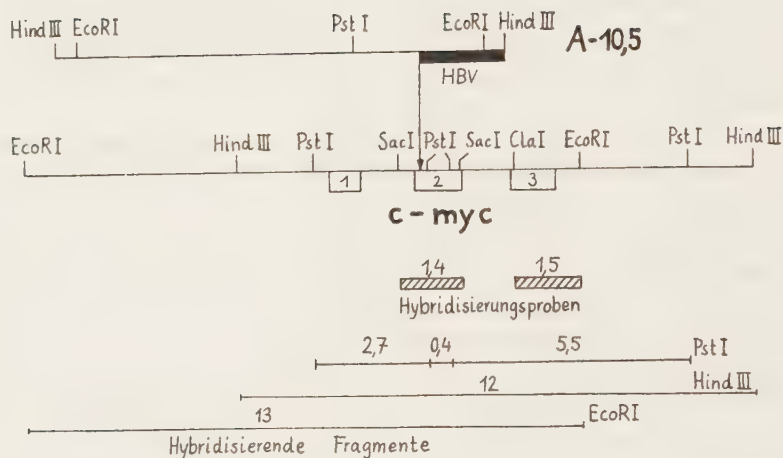


Abb. 29: Vergleich von A-10,5 mit dem humanen c-myc-Gen

A-10,5, dessen HBV-naher Bereich schwach mit dem Exon 2 des humanen c-myc hybridisiert, wird mit dem c-myc-Gen verglichen. Die HBV-DNA in A-10,5 ist als dunkler Balken gezeichnet, die Exons 1 bis 3 des c-myc sind als Kästchen dargestellt. Eingezeichnet sind außerdem die für die Experimente bedeutsamen Restriktionsstellen (Für Pst I, Sac I und Cla I sind die Karten nicht vollständig). Die für die Hybridisierungen verwendeten, ^{32}P -markierten Restriktionsfragmente (schraffierte Balken) wurden aus dem Plasmid pCMYC (Battey et al. 1983) isoliert: Das 1,4 kb große "Exon-2-Fragment" entsteht durch Schnitt mit Sac I, das 1,5 kb große "Exon-3-Fragment" durch Inkubation mit Cla I und Eco RI. Im unteren Teil der Abbildung sind die mit den markierten c-myc-Fragmenten hybridisierenden DNA-Stücke dargestellt, die beim Vorliegen des intakten c-myc-Gens erwartet werden. Ihre Größen sind in Kilobasenpaaren angegeben.

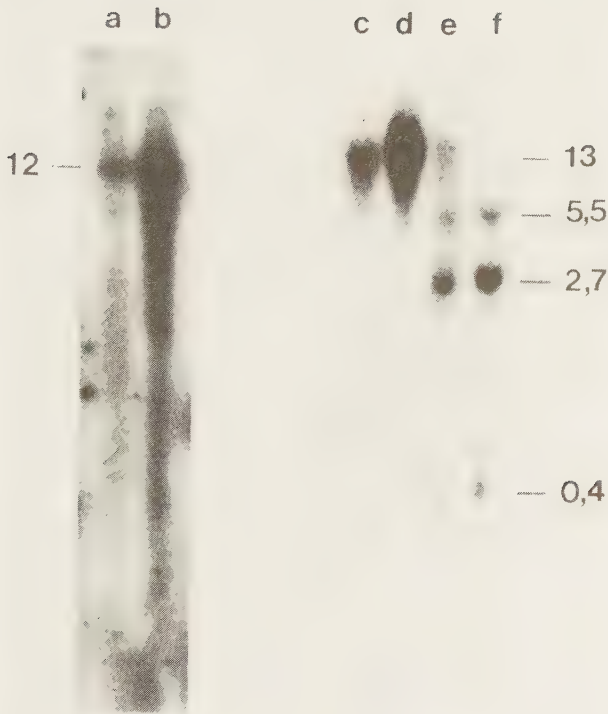


Abb. 30: Southern Analyse des c-myc-Gens im PLC/PRF/5-Genom
 DNA der PLC/PRF/5-Zellen wurde mit Hind III (a), Eco RI (c) und Pst I (e) geschnitten. Zum Vergleich wurde normale, humane DNA mit Hind III (b), Eco RI (d) und Pst I (f) inkubiert. Diese DNA wurde in einer Southern Analyse mit ^{32}P -markierter DNA des Exons 2 aus dem humanen c-myc hybridisiert. Es werden in allen Fällen die erwarteten Banden (Abb. 29) sichtbar. Ihre Größen sind in Kilobasenpaaren angegeben.

bedeutet, daß A-10,5 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht einen Teil des c-myc-Gens, sondern eine entfernt verwandte Sequenz enthält.

4. DISKUSSION

4.1. Struktur der integrierten HBV-DNA

Das Genom der humanen Hepatoma-Zelllinie PLC/PRF/5 enthält mindestens sechs DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA. Vier davon konnten kloniert werden. Da die gewünschten Klone aus viraler und flankierender humaner DNA bestehen sollten, wurde für die Klonierungsstrategie das Enzym Hind III verwendet, von dem bekannt war, daß es in allen bisher veröffentlichten HBV-Genomen nicht schneidet. Mit Hilfe dieses Restriktionsenzym sollten deshalb DNA-Fragmente entstehen, bei denen die integrierte HBV-DNA auf beiden Seiten von humanen Sequenzen flankiert ist. Der Klon A-6,0 entspricht diesen Vorstellungen. Jedoch ist in den anderen drei DNA-Fragmenten (A-4,0, A-10,5, A-10,7) unerwarteterweise eine Hind III-Stelle im viralen Genom vorhanden, weswegen in diesen Fällen nur ein Teil der integrierten HBV-DNA und nur jeweils eine der flankierenden, humanen Sequenzen kloniert werden konnte.

Wie die Restriktionsanalysen und die DNA-Sequenzierung der Klone A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 ergeben haben, sind die integrierten HBV-Sequenzen in großen Teilen kolinear mit den publizierten HBV-Genomen. Ausnahmen stellen die Inversion und die Duplikation bei A-4,0 und die Deletion bei A-6,0 dar.

Alle vorhandenen HBV-Sequenzen der vier Klone A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 enthalten das HBs-Gen. Jedoch führen nur drei der Klone (A-4,0, A-10,5, A-10,7) nach Transfektion in Ltk-Zellen zur Synthese dieses viralen Proteins. Die Intaktheit dieses Gens konnte also in diesen Fällen an der Expression von HBsAg nachgewiesen werden. Aus Southern Analysen der Gesamt-DNA des PLC/PRF/5-Genoms läßt sich schließen, daß auch die anderen, unklonierten, integrierten HBV-Kopien das HBs-Gen ohne nachweisbare Veränderungen, wie große Deletionen oder Insertionen,

enthalten. Denn ein 1,4 kb großes Eco RI-Nco I-Fragment, das dieses Gen beinhaltet, ist in der Hybridisierung der Gesamt-DNA aus PLC/PRF/5-Zellen mit markierter HBV-DNA deutlich sichtbar.

Ob auch das HBc-Gen ebenso konserviert erhalten ist, konnte durch ähnliche Experimente wegen des Fehlens geeigneter Schnittstellen nicht untersucht werden. Von den klonierten Fragmenten enthält nur A-6,0 die HBc-Region. Bei den anderen Klonen ist dieser Bereich auf Grund der viralen Hind III-Stelle abgetrennt, und deshalb nicht in den klonierten Fragmenten vertreten. Der kodierende Bereich des HBc-Gens ist in A-6,0, soweit er durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzierung charakterisiert werden konnte, bis auf das deletierte Stop-Kodon als unverändert anzusehen. Diese Mutation könnte einer der Gründe dafür sein, daß keine Expression des HBcAg nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen der Expression könnte aber neben einer Mutation im Gen auch Effekten der Regulation und der Transkription zugeschrieben werden (Kapitel 3.6.2.1.).

Von anderen Gruppen (Dejean et al. 1983, Shaul et al. 1984) aus den PLC/PRF/5-Zellen klonierte Fragmente mit integrierter HBV-DNA enthalten in nahezu allen Fällen das gesamte HBs-Gen, während das HBc-Gen völlig fehlt oder Deletionen aufweist. Diese Daten korrelieren gut mit dem Befund, daß T-Zellen die infizierten Hepatozyten am HBcAg erkennen, das in geringen Konzentrationen auf der Zellmembran vorkommt (Thomas et al. 1982). Durch die Lyse HBcAg exprimierender Zellen wird auf diejenigen Zellen selektioniert, die einen Defekt im HBc-Gen aufweisen.

Bei anderen Hepatomzelllinien sind größere Rearrangements publiziert, durch die nach der Integration der viralen DNA das HBc-Gen deletiert worden sein soll, oder sich das HBs-Gen über eine RNA-Vorstufe selbstständig integriert haben soll (Koike et al. 1983). Allerdings muß berücksichtigt werden, daß in der zitierten Veröffentlichung diese

Schlüsse aus Hybridisierungsergebnissen mit Hind III-geschnittener, zellulärer DNA gezogen wurden. Da in der vorliegenden Arbeit bei integrierter HBV-DNA Hind III-Stellen gefunden wurden, die gerade das HBs- vom HBc-Gen trennen, müssen solche Folgerungen mit Vorbehalt betrachtet werden.

Beim mit HBV verwandten Woodchuck-Hepatitis-Virus wird von sehr großen Veränderungen im integrierten, viralen Genom berichtet, die zu völliger Funktionslosigkeit der Sequenzen führen (Ogston et al. 1982). Offenbar sind solche Rearrangements nicht als Hepadna-Eigenheit anzusehen, sondern sind eher vom Wirt abhängig. Damit wird deutlich, daß dieses Tiermodell nicht unbedingt geeignet ist, Hinweise für die Entstehung des humanen Leberkarzinoms zu geben.

4.2. Integration von HBV-DNA

4.2.1. Integration im Vergleich mit anderen Viren

Die Integration von HBV-DNA erfolgt nicht an bestimmten Stellen des zellulären Genoms, sondern unspezifisch, wie auch bei vielen anderen animalen Viren. Ob es dabei, wie bei Rous-Sarkoma-Virus (Hughes et al. 1981), immer zu Verdopplungen der flankierenden, zellulären DNA-Sequenzen kommt, kann noch nicht beantwortet werden, da in drei der vier klonierten DNA-Fragmente nur jeweils eine der flankierenden, humanen Bereiche vorhanden ist. A-6,0 enthält einen 3 bp langen "inverted repeat". Das läßt aber immerhin vermuten, daß auch die anderen Integrate von vergleichbaren DNA-Sequenzen flankiert sein könnten.

Bei den Retroviren spielen die "long terminal repeats" (LTR) eine Rolle bei der Integration. Die "nick-gap-Struktur" bei HBV-DNA ergibt ebenfalls direkte, terminale Duplikationen, wenn sich die DNA-Stränge in diesem Bereich voneinander trennen würden. Deshalb war spekuliert worden,

daß diese Struktur des HBV-Genoms eine den LTRs der Retroviren vergleichbare Funktion hat. Die Untersuchung der klonierten Fragmente zeigt aber, daß die vermuteten, terminalen Duplikationen offenbar nicht diese Bedeutung haben, denn die HBV-DNA ist nicht an beiden Seiten vom Bereich zwischen "nick" und "gap" flankiert. Im Insert A-6,0, das beide Integrationsstellen enthält, findet sich keine Verdopplung dieses Bereichs. Auch bei A-4,0, A-10,5 und A-10,7 erfolgte die Integration so, daß sie im Widerspruch zu den für LTR-ähnliche Elemente erwarteten Vorstellungen steht. Die Integrationsstellen liegen nämlich wie bei A-6,0 in der "gap"-Region und nicht, wie das Modell fordert, in der Nähe des "nick".

Auch bei zwei weiteren, aus dem Genom der PLC/PRF/5-Zellen klonierten, integrierten HBV-Kopien liegt wenigstens eine Integrationsstelle im Bereich des "gap" (Shaul et al. 1984). Nur zwei andere, von denen eine der von Dejean et al. (1983) isolierten entspricht, öffneten sich zur Integration in einem anderen Bereich.

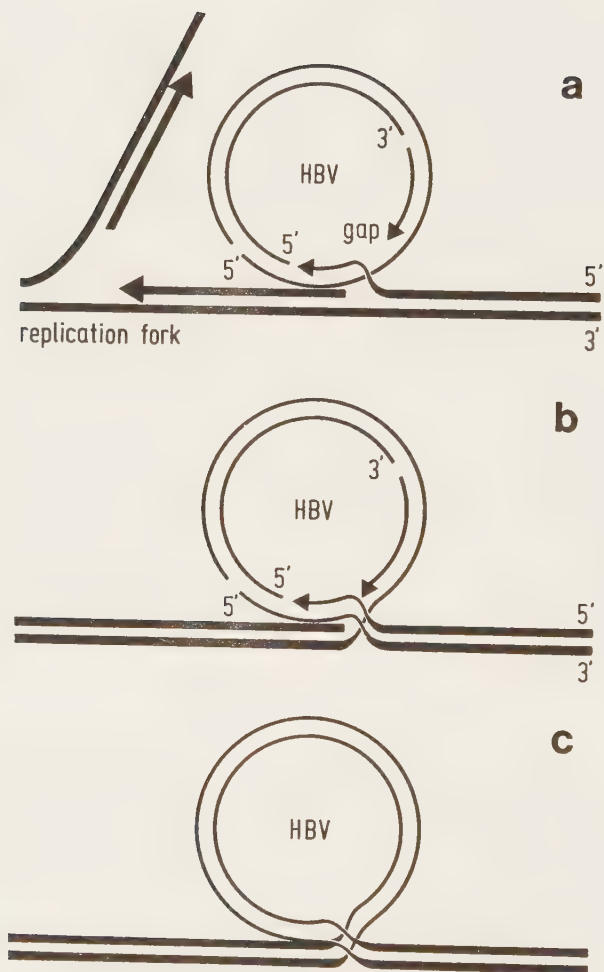
4.2.2. Modell zur Integration von HBV-DNA

Auffällig bei der Untersuchung der viralen-humanen Übergänge ist, daß in allen Klonen die viralen Integrationsstellen in der "gap"-Region, nahe dem 5'-Ende des im Dane-Partikel kurzen DNA-Stranges, liegen. Die im Folgenden dargestellte Hypothese zur Integration von HBV-DNA berücksichtigt diese Tatsache. Das Modell bezieht auch noch einen klinischen Aspekt mit ein. Es wurde nämlich gefunden, daß 95% aller sehr junger Kinder, die mit HBV infiziert sind, zu Virusträgern werden, was meist mit Integration der HBV-DNA verbunden ist. Dagegen ist bei Erwachsenen das Risiko des Trägerstadiums signifikant niedriger (Beasley 1982). Da sich Hepatozyten, die Zielzellen des HBV, bei Kindern im Gegensatz zu Erwachsenen noch sehr oft teilen und damit auch eine hohe DNA-Replikationsrate aufweisen, könnte

die Integration der HBV-DNA mit diesen Phänomenen in Beziehung stehen.

Auf Grund dieser Betrachtungen kann man Folgendes annehmen: Während der Replikation der zellulären DNA "springt" eine DNA-Polymerase, die gerade an einem zellulären Template arbeitet, auf den einzelsträngigen Bereich des HBV-Genoms und verbindet dabei bereits virale und humane Sequenzen kovalent miteinander. Dieser Sprung ist auf die "gap"-Region nahe des 5'-Endes des kurzen Stranges begrenzt, da DNA-Polymerasen, die vom 3'-Ende des kurzen Stranges starten, die einzelsträngige Region verkürzen (Abb. 31a). Ein Rekombinationsereignis verbindet dann den langen Strang mit dem zellulären Strang, der vorher als Template gedient hat (Abb. 31b). Schließlich werden die einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt und ligiert, wobei die HBV-DNA vollends integriert (Abb. 31c). Es ist möglich, daß dieser Mechanismus auch in anderen Regionen des viralen Genoms stattfindet, so z.B. beim natürlicherweise vorkommenden "nick", der aus einem kurzen, einzelsträngigen Bereich besteht (Delius et al. 1983). Jedoch sollte die Integration bevorzugt in der großen, einzelsträngigen Region des "gap" erfolgen.

Computeranalysen der sequenzierten Bereiche ergaben Homologien zwischen viralen und humanen Sequenzen (Tab. 2) "links" von der Integrationsstelle in Abbildung 32. Diese Homologien sind nicht direkt an der Rekombination und Integration beteiligt, sie könnten aber durch Basenpaarung bei der Positionierung des viralen Genoms an der zellulären DNA helfen und so die Rekombination erleichtern. Die homologen Bereiche sind nur in relativ geringer Anzahl im humanen Genom vorhanden, da sie nicht in einer Nukleinsäure-Datenbank von 1,3 Millionen Basen gefunden werden. Falls solche Homologien das Integrationsereignis in die Nähe der korrespondierenden Regionen im humanen Genom dirigieren, sollte die Integration nicht völlig zufällig sein. Da ähnliche Homologien auch bei anderen integrierten Viren,



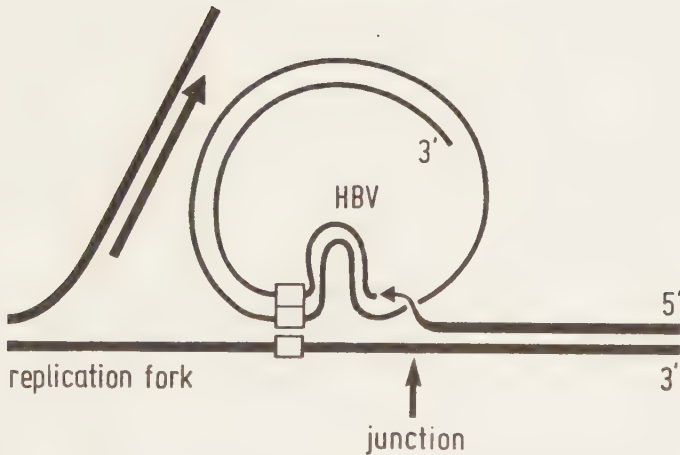


Abb. 31, 32: Modell für den Mechanismus der Integration von HBV-DNA

Während der Replikation der zellulären DNA springt eine DNA-Polymerase auf die einzelsträngige Region ("gap") des HBV-DNA-Moleküls. Dieser Vorgang findet mit höherer Wahrscheinlichkeit nahe des 5'-Endes des kurzen Strangs statt, da die "gap"-Region schnell von DNA-Polymerasen verkürzt wird, die vom 3'-Ende des kurzen Strangs ausgehend synthetisieren (Abb. 31a). Es kommt zur Rekombination zwischen dem langen, viralen Strang und dem zellulären DNA-Strang, der vorher als Template für die DNA-Polymerase gedient hat (Abb. 31b). Wenn die einzelsträngigen Bereiche aufgefüllt und die freien DNA-Enden miteinander ligiert sind, ist die HBV-DNA vollständig integriert (Abb. 31c). Sequenzhomologien zwischen zellulärer und viraler DNA in der Nähe der Integrationsstelle, die durch offene Rechtecke dargestellt sind, könnten dabei helfen, die virale DNA zu positionieren und dadurch die Rekombination zu erleichtern (Abb. 32).

z.B. bei Adenoviren (Deuring et al. 1981, Gahlmann et al. 1982) gefunden wurden, könnte die Positionierung von viraler DNA durch Bindung an einen von der Integrationsstelle etwas entfernten Punkt eine allgemeine Eigenschaft der Integration von animalen DNA-Viren sein.

4.3. Onkogene Effekte bei der Integration von HBV-DNA

4.3.1. Enthält HBV ein Onkogen?

Da auch Virus-Träger, die hohe Titer an HBV im Blut aufweisen, Tumoren nur nach langer Zeit entwickeln, ist auszuschließen, daß HBV an sich onkogen ist. Trotzdem wurde spekuliert, daß einer der Leserahmen, deren Funktion nicht eindeutig geklärt ist (P und X), für ein transformierendes Protein kodiert. Da die Zellen des Lebertumorgewebes und des Peritumorbereichs in vielen Fällen integrierte HBV-DNA enthalten, könnte der onkogene Effekt dieser Leserahmen vielleicht erst nach Integration ins Wirtsgenom wirksam werden. Die Analyse der HBV-DNA enthaltenden Klone aus dem PLC/PRF/5-Genom erbringt den zunächst enttäuschenden Befund, daß die P- und X-Leserahmen durch die Integration zerstört sind. Die unter diesen Bedingungen entstehenden Proteine sollten defekt sein und keine Funktion haben. Vielleicht ist das Gegenteil der Fall. Wie die Sequenzanalyse zeigt, könnten Fusionsproteine entstehen, die am C-terminalen Ende human kodierte Aminosäuren tragen. Diese Fusionsproteine könnten für die onkogenen Effekte verantwortlich sein. Da über Translation der P- und X-Leserahmen nichts bekannt ist, scheint auch die Expression der Fusionsproteine fraglich zu sein. Immerhin ist für das X-Gen die Transkription in Rattenzellen nachgewiesen (Gough 1983), so daß auch die Synthese eines der Fusionsproteine durchaus möglich ist.

4.3.2. Integriert HBV-DNA in der Nähe eines zellulären Onkogens?

Diese Frage kann für die aus dem Genom der PLC/PRF/5-Zellen klonierten Fragmente nicht eindeutig beantwortet werden, da nur 11 von den bisher bekannten Onkogenen, d.h. etwa die Hälfte, für die Experimente zur Verfügung standen. Außerdem enthalten drei der vier klonierten Fragmente mit integrierten HBV-Sequenzen nur jeweils eine der beiden flankierenden, humanen DNA-Bereiche.

Allerdings konnte mit einem der klonierten Fragmente, A-10,5, eine schwache, aber deutlich positive Hybridisierung mit dem Exon 2 des c-myc-Gens nachgewiesen werden, was die Integration von HBV-DNA in dieses Exon möglich erscheinen ließ. Da die Struktur des c-myc-Gens im PLC/PRF/5-Genom keine Veränderungen zeigte, die bei Integration von DNA erwartet werden, ist das mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der Fall. Es gibt jedoch humane Sequenzen, die mit dem c-myc-Gen verwandt sind. Deren Funktion ist leider nicht bekannt (Dalla Favera et al. 1982). Eine Integration von HBV-DNA in diese Bereiche würde die bei A-10,5 erhaltene Hybridisierung mit myc-Sequenzen erklären.

Denkbar wäre aber auch folgende Erklärungsmöglichkeit. HBV-DNA integrierte tatsächlich in das c-myc-Gen, wurde anschließend exzidiert, wobei flankierende, humane DNA mit erfaßt wurde, und integrierte wieder an anderer Stelle in das humane Genom. Das gesamte c-myc-Gen, in das die HBV-DNA ursprünglich integrierte, muß nach der Reintegration des transponierten, HBV-DNA enthaltenden Fragments völlig eliminiert worden sein, denn sonst hätte die so veränderte Struktur des c-myc nachgewiesen werden können. Diese Erklärung scheint sehr spekulativ zu sein, Karyotypanalysen der PLC/PRF/5-Zellen zeigen aber, daß das durchaus möglich sein kann. Das Chromosom 8, welches das c-myc trägt, ist nämlich nur einmal vorhanden (Marquardt et al. 1984 b). Vielleicht enthielt das fehlende Chromosom 8 das c-myc, in

welches die HBV-DNA ursprünglich integriert war. Die Eliminierung eines der allelen Chromosomen könnte zur malignen Transformation beigetragen haben, wenn das noch vorhandene Chromosom eine Mutation im c-myc hätte, deren Wirkung erst sichtbar wird, wenn das normale Allel fehlt. Allerdings läßt sich nicht völlig ausschließen, daß doch beide Chromosomen 8 vorhanden sind, denn durch Fusion mit einem anderen Chromosom könnte eines der Markerchromosomen entstanden sein, die nicht bestimmten Chromosomen zugeordnet werden können.

4.3.3. Zerstörung eines humanen Gens

Integration von DNA in ein Wirtsgen führt zur Zerstörung dieses Gens. In der zellulären DNA gibt es jedoch auch nicht-kodierende Bereiche. Wenn HBV-DNA in solchen Regionen integriert, könnte das ohne Bedeutung für die Zelle sein. Die virale Integration in nicht-kodierende Bereiche kann aber auch in diesem Fall die Expression von zellulären Genen stören. So könnte eine starke Transkription eines, z.B. viralen Gens die mRNA-Synthese eines benachbarten, zellulären Gens beeinträchtigen. Aber die Transkription viraler Gene ist nicht unbedingt notwendig, um Störungen zu verursachen. Am Beispiel eines in ein Intron integriertes Retrovirus wurde gezeigt, daß durch die virale DNA die Chromatinstruktur so verändert wird, daß die Synthese der funktionsfähigen mRNA unterbunden ist (Breindl et al. 1984).

Die Analyse der Klone A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 zeigt, daß die oben beschriebenen Situationen möglich sind. Die Anwesenheit von humanen Polyadenylierungssignalen in der Nähe der HBV-DNA (A-4,0 und A-10,7; Abb. 18, 20) kann bedeuten, daß die Integration in ein zelluläres Gen erfolgte. Außerdem konnte die Deletion humaner Sequenzen in Verbindung mit der Integration von HBV-DNA nachgewiesen werden (A-6,0). Deletionen bereits eines der im humanen Genom vorkommenden Allele kann zur Tumorbildung führen

(Benedict et al. 1982). In A-10,7 läuft ein großer, zellulärer Leserahmen auf die integrierte HBV-DNA zu (Abb. 16). Seine Transkription könnte durch die gegenläufige Transkription, die vom starken, konstitutiven (Malpice et al. 1983) HBs-Promotor ausgeht, gestört werden.

4.3.4. Stimulation eines humanen Gens

Die Stimulation eines humanen Gens durch einen starken, viralen Promotor kann, wenn es sich um ein Onkogen handelt, zur Tumorbildung führen (Klein 1981, 1983). Da die Transkription des HBs-Gens wegen des Fehlens des viralen Polyadenylierungssignals zur Synthese von mRNA führt, die in die humanen, flankierenden Sequenzen reicht, ist eine Stimulation auf diese Weise denkbar. Bei A-6,0 und A-10,5 könnten dabei humane Leserahmen transkribiert werden, deren Ausdehnung aber nicht bestimmt werden konnte, da sie in den unsequenzierten Bereichen der humanen DNA enden (Abb. 19, 20). A-10,7 enthält einen genau definierten, humanen Leserahmen (Abb. 20), der tatsächlich transkribiert wird, wie die S1-Kartierung der mRNA zeigt (Freytag von Loringhoven 1984). Die Expression dieses Leserahmens würde zu einem relativ kleinen Protein von 43 Aminosäuren führen. Die geringe Größe dieses hypothetischen Proteins schließt eine onkogene Wirkung nicht aus, denn es sind transformierende Proteine ähnlicher Größe bekannt. So hat das B-lym-Protein 59 Aminosäuren (Goubin et al. 1983). Falls dieses Protein tatsächlich exprimiert werden würde, wäre das allein schon bemerkenswert. Denn das würde bedeuten, daß von einer mRNA mehr als ein Leserahmen translatiert wird. Bisher ist eine solche polycistronische mRNA nur bei Prokaryonten nachgewiesen. Denkbar ist aber auch, daß die mRNA, die vom HBs-Promotor ausgeht, durch Splicing so prozessiert wird, daß eine monocystronische mRNA entsteht, die nur noch den humanen Leserahmen enthält. Das ist durchaus möglich, denn es ist bekannt, daß ein Teil der HBs-mRNA durch Splicing prozessiert wird (Simonsen & Levinson 1983). Allerdings

befindet sich in diesem Fall der herausgeschnittene Teil der RNA nicht kurz nach dem Promotor, sondern im 3'-Teil des HBs-Gens. Der HBs-Leserahmen wird deshalb nur verkürzt, aber nicht völlig eliminiert. Es könnte dadurch also nur ein Fusionsprotein mit viralem und humanem Anteil entstehen. Eine andere Möglichkeit für die Expression des humanen Leserahmens besteht darin, daß nicht in allen Fällen das erste AUG als Start für die Translation erkannt wird.

Eine Stimulierung auch weiter entfernter, zellulärer Gene besteht in der Wirkung eines Enhancers, der eine Reichweite von bis zu 10 kb (Khoury & Gruss 1983) haben kann. HBV-DNA enthält eine solche Sequenz, deren Anwesenheit in A-4,0, A-10,5 und A-10,7 durch Sequenzanalyse nachgewiesen werden konnte.

Auch die Integration in regulatorische Sequenzen kann einen Einfluß auf die Expression zellulärer Gene ausüben. Als Spezialfall könnte dabei ein Regulator eines zellulären Onkogens getroffen werden. Solche Konstellationen sind schwer nachzuweisen, da über die Regulation von Onkogenen wenig bekannt ist, und auch keine klonierten Regulatoren für Hybridisierungsexperimente zur Verfügung stehen. Eine Hybridisierungsprobe würde auch nicht in allen Fällen bei der Untersuchung dieser Frage helfen, da der Regulator beim Integrationsereignis deletiert worden sein könnte und damit garnicht nachweisbar wäre. Die Transfektion klonierter Fragmente in NIH3T3-Zellen führt nur dann zum Nachweis von veränderten Regulatoren, wenn diese stimulatorisch wirken und außerdem nicht art- oder zellspezifisch sind. Ein zerstörter Regulator, der in der Tumorzelle Effekte zeigen kann, wird durch den intakten Regulator der NIH3T3-Zellen kompensiert. Da zwei der Klone (A-4,0 und A-10,5) repetitive DNA enthalten, der regulatorische Funktion zugeschrieben wird, sind auch Effekte auf die Regulation denkbar.

4.3.5. Amplifikation und Rearrangement

Der direkte Sequenzvergleich der viralen-humanen Übergänge in den Klonen A-10,5 und A-10,7 beweist, daß die Integration in beiden Fällen am gleichen Nukleotid stattgefunden hat, und daß von den ersten 187 Basen der humanen, flankierenden DNA 184 Basen identisch sind. Jenseits dieses Bereichs sind die humanen Sequenzen der beiden Klone völlig voneinander verschieden. Außerdem zeigt ein Vergleich der Restriktionskarten durchgängige Identität der viralen Sequenzen. All diese Eigenschaften deuten auf eine nahe Verwandtschaft zwischen diesen beiden Klonen hin, für die gezeigt wurde, daß sie echte Kopien von entsprechenden zellulären DNA-Fragmenten sind. Ein drittes, 18 kb großes Fragment ist mit hoher Wahrscheinlichkeit im viralen Anteil und in Teilen der flankierenden, humanen DNA-Sequenzen identisch mit A-10,5 und A-10,7 (Abb. 21).

Zwei Möglichkeiten sind zur Erklärung dieser Ergebnisse denkbar. Erstens der unwahrscheinliche Fall von drei unabhängigen Integrationen, die genau an den gleichen Positionen in viralen und in zellulären Sequenzen stattfanden. Zweitens eine Situation, in welcher eine der integrierten HBV-Sequenzen aus der anderen hervorgegangen ist. Nach einer ersten Integration wurden dabei die HBV-DNA und mit ihr flankierende, humane Sequenzen amplifiziert. Anschließend brachten Transpositionen oder große Deletionen humane Sequenzen, die normalerweise weiter entfernt sind, nahe an die Integrationsstelle. Die Deletionen müssen bei A-10,5 und A-10,7 größer als 8 kb sein, da in den flankierenden Anteilen nicht nur die Restriktionskarten sehr unterschiedlich sind, sondern auch keine Homologien durch Hybridisierung feststellbar sind.

Mit Hilfe der Southern Analyse der Gesamt-DNA der PLC/PRF/5-Zellen konnten auffallend stark mit HBV-DNA hybridisierende DNA-Fragmente nachgewiesen werden, die aus viraler und humaner DNA bestehen müssen. Aus der Stärke der

Signale läßt sich schließen, daß diese Fragmente nicht in einer sondern in mehreren Kopien pro Zelle vorliegen. Deshalb wird vermutet, daß Amplifikationen und anschließende Rearrangements nicht auf die drei oben genannten, humanen DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA beschränkt sind.

Die Analyse des Karyotyps der PLC/PRF/5-Zellen machte außer chromosomalen Duplikationen und Translokationen auch Abnormalitäten in der Anzahl der Chromosomen sichtbar (zwischen 48 und 61; Alexander et al. 1976). Es ist daher vorstellbar, daß die Amplifikation der DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA auf eine Verdopplung eines gesamten Chromosoms zurückgeht. In einem dieser verdoppelten, allelen Chromosomen, könnte die humane DNA in der Nähe der HBV-DNA deletiert worden sein, was zu den Veränderungen führte, die in den Klonen A-10,5 und A-10,7 nachgewiesen werden konnten. Andererseits könnte aus einem der verdoppelten Chromosomen auch ein Segment, das virale und humane DNA enthält, ausgeschnitten und an einer anderen Stelle integriert worden sein.

Über Instabilität von integrierten, viralen Genomen, die schnell maligne Transformation in geeigneten Zellkulturen auslösen kann, wurde bei SV40 und Adenoviren berichtet (Mougueau et al. 1980, Tooze 1980, Hiscott et al. 1981, Clayton & Rigby 1981). Größere Rearrangements zellulärer Sequenzen stehen bekanntermaßen im Bezug zur Bildung einiger Krebsarten. So können Translokationen oder Transpositionen zelluläre Onkogene unter den Einfluß eines starken Promotors (Klein 1981) oder Enhancers bringen. Da Lebertumoren erst relativ spät nach der HBV-Infektion auftreten, muß angenommen werden, daß die integrierte HBV-DNA immer wieder von Translokationen erfaßt wird, die anfangs von der Zelle toleriert werden. Die Häufigkeit dieser Rearrangements ist wahrscheinlich der bestimmende Faktor für die Entwicklung der malignen Transformation. Weitere Experimente mit anderen Onkogenen sind notwendig. Möglich ist allerdings auch, daß hier noch unbekannte zelluläre Sequenzen betroffen sind, die

ebenfalls eine Rolle bei der Transformation spielen könnten.

4.3.6. Mögliche onkogene Mechanismen der integrierten HBV-DNA

Epidemiologische Daten (Beasley 1982) weisen auf eine enge Beziehung zwischen HBV und der Entwicklung eines Hepatoms beim Menschen hin. Die Untersuchung der DNA-Fragmente A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7, die aus dem Genom der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5 kloniert worden waren, lieferten jedoch keinen eindeutigen Beweis dafür, daß diese DNA-Fragmente oder die in ihnen enthaltene HBV-DNA mit der Onkogenese der PLC/PRF/5-Zellen in Beziehung stehen. Jedoch zeigt die Gesamt-DNA der PLC/PRF/5-Zellen im NIH3T3-System onkogenes Potential. Da die Transfektion dieser DNA in NIH3T3-Zellen zur Foci-Bildung führt, die klonierten Fragmente aber keine Transformation auslösen, liegt diese Eigenschaft der PLC/PRF/5-DNA offenbar in einem anderen Teil des zellulären Genoms. Die PLC/PRF/5-DNA enthält mindestens sechs integrierte HBV-DNA-Kopien. Da bisher nur vier davon kloniert und intensiv untersucht worden sind, ist es vorstellbar, daß eines der unklonierten DNA-Fragmente mit integrierter HBV-DNA transformierend wirken könnte. Möglich wäre auch, daß die klonierten DNA-Fragmente zu kurz sind, um ihre onkogenen Eigenschaften zu zeigen. Das gilt besonders im Fall von A-4,0 und A-6,0, bei denen der humane Anteil sicher kein gesamtes, eukaryotisches Gen enthalten kann.

Fraglich ist, ob das Onkogen, welches im PLC/PRF/5-Genom enthalten ist und im NIH3T3-System transformierend wirkt, auch für die Tumorgenese der PLC/PRF/5-Zellen verantwortlich, oder wenigstens daran beteiligt ist. Es ist nämlich bekannt, daß in vivo mehrere Onkogene für die Transformation einer Zelle nötig sind, und daß nur bestimmte Kombinationen von Onkogenen transformierend wirken. Auch PLC/PRF/5-Zellen müssen deshalb nicht nur ein, sondern mehrere Onkogene

enthalten. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß NIH3T3-Zellen bereits so weit verändert sind, daß ein einziges Onkogen für die maligne Transformation ausreicht. Im NIH3T3-System lassen sich deshalb nur diejenigen Onkogene nachweisen, die in Kombination mit den, in NIH3T3-Zellen bereits vorhandenen Onkogenen zur Transformation führen.

Zusätzlich muß noch berücksichtigt werden, daß verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf das gleiche Onkogen reagieren. Das bedeutet, daß ein Onkogen, welches für PLC/PRF/5-Zellen von Bedeutung ist, also in einer humanen Hepatozyte einen Effekt zeigt, in einer NIH3T3-Zelle, d.h. einem Mausfibroblasten, völlig wirkungslos sein kann.

Aus diesen Überlegungen läßt sich schließen, daß auch die aus dem PLC/PRF/5-Genom klonierten DNA-Fragmente A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 durchaus eine Rolle bei der Tumorgenese gespielt haben könnten, obwohl sie keinen Effekt im NIH3T3-System zeigen. Da HBV mit der Entstehung von Lebertumoren korreliert wird, war es gerechtfertigt, die Veränderungen, welche diese humanen DNA-Fragmente durch die Integration von HBV-DNA erfahren haben, auf ihre potentiellen, onkogenen Wirkungen zu untersuchen.

Wie oben bereits geschildert, hilft das NIH3T3-System bei dieser Fragestellung nicht weiter. Die mögliche zellspezifische Wirkungsweise von Onkogenen könnte für die aus dem PLC/PRF/5-Genom klonierten DNA-Fragmente am besten in Hepatozyten-Zelllinien untersucht werden, wenn diese in vergleichbarer Weise wie die NIH3T3-Zellen transformiert werden könnten. Leider gibt es solche Zelllinien nicht.

Darum wurde durch Hybridisierung mit den klonierten Onkogenen abl, erb, fes, fms, Ha-ras, Ki-ras, myb, myc, sis, src und yes nach dem Vorhandensein homologer Sequenzen in A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 gesucht. Der starke, konstitutive HBs-Promotor könnte im Fall der Integration von

HBV-DNA in der Nähe eines der Onkogene die Expression dieser Gene erhöhen und dadurch zur Tumorgenese beitragen. In A-10,5 konnten tatsächlich Sequenzen eines Onkogens, nämlich des myc, nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß diese Sequenzen entweder nur nahe mit myc verwandt sind, oder aber das myc-Gen in diesem Fall so verändert vorliegt, daß das myc-Protein nicht exprimiert werden kann. Die Erhöhung der Expression eines zellulären Proto-Onkogens durch Integration von HBV-DNA scheint deshalb in den klonierten Fragmenten nicht möglich zu sein.

Die Stimulation eines zellulären Proto-Onkogens durch Integration viraler DNA ist bei den "langsamen", onkogenen Retroviren, die kein eigenes Onkogen besitzen, bekannt. Da die Entstehung eines Leberkarzinoms ebenfalls lange dauert, wäre für HBV der bei diesen Viren verwirklichte Mechanismus erwartet worden. Mit den onkogenen Retroviren, die in ihrem Genom ein Onkogen enthalten, welches einem zellulären Proto-Onkogen entspricht, ist HBV wegen des Fehlens eines solchen Gens überhaupt nicht vergleichbar.

Eine gewisse Ähnlichkeit könnte jedoch zwischen HBV und einem anderen Vertreter der onkogenen Retroviren, dem "Human T-Cell Leukaemia Virus" (HTLV) bestehen. HTLV trägt in seinem Genom einen Leserahmen X, der für die onkogene Potenz dieses Virus verantwortlich gemacht wird (Weiss 1984). Die DNA-Sequenz dieses X-Leserahmens findet keine Entsprechung in der zellulären DNA, wie das bei den viralen Onkogenen anderer Retroviren der Fall ist. Auf Grund dieser Eigenschaft könnte der X-Leserahmen des HTLV mit dem HBV-Leserahmen X, dessen Bedeutung unbekannt ist, verglichen werden. Da HTLV aber relativ schnell onkogene Wirkungen im Organismus zeigt, sind die beiden X-Leserahmen zumindest in ihrer Funktion unterschiedlich.

Es ist jedoch vorstellbar, daß HBV im Bezug auf die Tumorgenese eine Mittelstellung zwischen HTLV und den "langsamen" onkogenen Retroviren einnimmt. So könnte nach

Integration der viralen DNA der X-Leserahmen oder ein anderer Leserahmen des HBV-Genoms in Verbindung mit zellulären Genen transformierend wirken. Dieser Mechanismus scheint durchaus möglich zu sein, denn bei allen in der PLC/PRF/5-DNA untersuchten HBV-Integraten reichen virale Leserahmen bis in die humanen DNA-Bereiche, und würden bei ihrer Translation virale-humane Fusionsproteine ergeben. Die Transkription all dieser Leserahmen wird auf Grund von Sequenzanalysen der Übergänge zwischen viraler und humaner DNA erwartet. Für einen Klon (A-10,7) konnte sie sogar nachgewiesen werden (Freytag von Loringhoven 1984). Ebenfalls wurde gezeigt, daß einige HBV-Integrate und die flankierende, humane DNA auf Grund von Amplifikation und anschließender Rearrangements verändert werden können, wobei wieder andere Fusionsproteine entstehen könnten.

Naheliegend ist es deshalb, zu untersuchen, ob diese hypothetischen Fusionsproteine tatsächlich exprimiert werden. Dazu sind in vitro Translationsexperimente oder Versuche mit Antikörpern gegen solche, z.B. in Bakterien synthetisierte Proteine notwendig. Sollte die Expression der Fusionsproteine nachgewiesen werden können, stellt sich die Frage nach ihrer Funktion. Studien dazu sollten nicht nur an Zellkulturen, sondern auch an Versuchstieren durchgeführt werden, um mögliche Wirkungen dieser Proteine auf den intakten Organismus nicht zu übersehen.

Die Möglichkeit, daß die transformierenden Eigenschaften der PLC/PRF/5-DNA außerhalb der bisher klonierten DNA-Fragmente liegen könnte, sollte jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden. So könnten mit der Technik des "chromosome walking" die an die Fragmente A-4,0, A-6,0, A-10,5 und A-10,7 angrenzenden DNA-Bereiche kloniert werden. Auf diese Weise könnten größere, zusammenhängende Genombereiche erhalten werden, bei denen ausgeschlossen werden kann, daß ein, eventuell durch integrierte HBV-DNA stimuliertes, humanes Gen durch die Klonierung eines zu kleinen Fragments inaktiv ist. Auch die bisher unklonierten

HBV-Integrate und möglichst große, flankierende, humane DNA-Bereiche sollten kloniert und auf onkogenes Potential untersucht werden.

Die maligne Transformation kann aber auch mit Deletionen zellulärer DNA in Beziehung stehen. Solche Deletionen könnten bei der Integration von HBV-DNA entstehen, worauf Experimente an A-6,0 hinweisen. Deshalb ist es lohnend, aus dem humanen Genom normaler Zellen die DNA-Bereiche zu klonieren, welche denen mit integrierter HBV-DNA des PLC/PRF/5-Genoms entsprechen. An diesen Klonen könnte untersucht werden, welche Gene durch die Deletion getroffen wurden und welche Folgen das für die Zelle hat.

Die Klonierung von vermutlich mit der Onkogenese in Beziehung stehenden DNA-Sequenzen ist aber nur eine Voraussetzung für all diese Experimente. Zusätzlich ist ein System notwendig, das die Untersuchung der transformierenden Eigenschaften erlaubt. Da angenommen wird, daß die Transformation zellspezifisch ist, muß die Prüfung der Funktion der klonierten DNA-Fragmente in diesem Fall in Hepatozyten erfolgen. Die Etablierung eines Hepatozyten-Systems für solche Untersuchungen ist deshalb der Schlüssel zur Beantwortung der Frage, ob und wie HBV onkogen wirkt.

5. LITERATUR

- Aaronson, S.A. & Todaro, G.J. (1968) Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science* 162: 1024-1026.
- Albin, C. & Robinson, W.S. (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J. Virol.* 34: 297-302.
- Alexander, J., Bey, E., Geddes, E. & Lecatsas, G. (1976) Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S. Afr. Med. J.* 50: 2124-2128.
- Appleyard, R.K. (1954) Segregation of lambda lysogenicity during bacterial recombination in *E. coli* K12. *Genetics* 39: 429-439.
- Batley, J., Moulding, C., Taub, R., Murphy, W., Stewart, T., Potter, H., Lenoir, G. & Leder, P. (1983) The human c-myc oncogene: Structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34: 779-787.
- Beasley, R.P. (1982) Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma - epidemiologic considerations. *Hepatology* 2(2): 21S-26S.
- Beasley, R.P., Lin, C.C., Hwang, L.Y. & Chien, C.S. (1981) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133.
- Bellamy, A.R. & Ralph, R.K. (1968) Recovery and purification of nucleic acids by means of cethyltrimethylammonium-bromide. *Meth. Enzymol.* 12: 156-160.

- Benedict, W.F., Murphree, A.L., Banerjee, A., Spina, A., Sparkes, M.C. & Sparkes, R.S. (1982) Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 219: 973-975.
- Benton, W.D. & Davies, R.W. (1977) Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182.
- Bianchi, L. & Gudet, F. (1979) Immunopathology of hepatitis B. In: Popper, H. & Schaffner, F. (Hrsg.), *Progress in Liver Disease*, Vol. 7, Grune & Stratton, New York, pp. 371-392.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Blumberg, B.S. & London, W.T. (1980) Hepatitis B virus and primary hepatocellular carcinoma: relationship of "icrons" to cancer. In: Essex, M., Todaro, G. & zur Hausen, H. (Hrsg.), *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, pp. 401-421.
- Bond, H.E. & Hall, W.T. (1972) Separation and purification of hepatitis-associated antigen into morphologic types by zonal ultracentrifugation. *J. Infect. Dis.* 125: 263-268.
- Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P. (1980) Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 286: 533-535.
- Brechot, C., Hadchouel, M., Scotto, J., Fonk, M., Potet, F., Vyas, G.N. & Tiollais, P. (1981) State of hepatitis B virus DNA in hepatocytes of patients with hepatitis B surface antigen-positive and -negative liver diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 3906-3910.

- Breindl, M., Harbers, K. & Jaenisch, R. (1984) Retrovirus-induced lethal mutation in collagen I gene of mice is associated with an altered chromatin structure. *Cell* 38: 9-16.
- Cattaneo, R., Will, H., Hernandez, N. & Schaller, H. (1983) Signals regulating hepatitis B surface antigen transcription. *Nature* 305: 336-338.
- Chakraborty, P.R., Ruiz-Opazo, N., Shouval, D. & Shafritz, A. (1980) Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* 286: 531-533.
- Clayton, C.E. & Rigby, P.W.J. (1981) Cloning and characterization of the integrated viral DNA from three lines of SV40-transformed mouse cells. *Cell* 25: 547-559.
- Cohen, B.J. & Richmond, J.E. (1982) Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature* 296: 677-678.
- Copeland, J.A., Skelly, J., Mann, G.F., Howard, C.R. & Zuckerman, A.J. (1980) Hepatitis B surface antigen production as a growth cycle related terminal event in PLC/PRF/5 hepatoma cells. *J. Med. Virol.* 5: 257-264.
- Courouce-Pauty, A.-M., Plancon, A. & Soulier, J.P. (1983) Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sang.* 44: 197-211.
- Cummings, I.W., Browne, J.K., Salser, W.A., Tyler, G.V., Snyder, R.L., Smolec, J.M. & Summers, J. (1980) Isolation, characterization and comparison of recombinant DNAs derived from genomes of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1842-1846.

- Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Martinotti, S., Franchini, G., Papas, T.S., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. (1982) Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6497-6501.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M. (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. *Lancet* I: 695-698.
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M., Chen, H.R., Barker, W.C., Hunt, L.T. & Orcutt, B.C. (1981) Nucleic acid sequence database. *DNA* 1(1): 51-58.
- DeLorbe, W., Luciw, P.A., Goodman, H.M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1980) Molecular cloning and characterization of avian sarcoma virus circular DNA molecules. *J. Virol.* 36: 50-61.
- Dejean, A., Brechot, C., Tiollais, P. & Wain-Hobson, S. (1983) Characterization of integrated hepatitis B viral DNA cloned from a human hepatoma and the hepatoma derived cell line PLC/PRF/5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2505-2509.
- Delius, H., Gough, N.M., Cameron, C.H. & Murray, K. (1983) Structure of the hepatitis B virus genome. *J. Virol.* 47(2): 337-343.
- DeLong, S. (1982) The relationship of hepatitis B virus infection to hepatoma: pros and cons. In: Szmuness, W., Alter, H.J. & Maynard, J.E. (Hrsg.), *Viral Hepatitis*, Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 253-259.
- Denhardt, D.T. (1966) A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 641-646.

- Deuring, G.R., Winterhoff, U., Tamanai, F., Stabel, S. & Doerfler, W. (1981) Site of linkage between adenovirus type 12 and cell DNAs in hamster tumour line CLAC3. *Nature* 293: 81-84.
- Doherty, P.C., Solter, D. & Knowles, B.B. (1977) H-2 gene expression is required for T cell-mediated lysis of virus-infected target cells. *Nature* 266: 361-362.
- Donner, L., Fedele, L.A., Garon, C.F., Anderson, S.J. & Sherr, C.J. (1982) McDonough feline sarcoma virus: Characterization of the molecularly cloned provirus and its feline oncogene (v-fms). *J. Virol.* 41: 489-500.
- Dugaiczky, A., Boyer, H.W. & Goodman, H.M. (1975) Ligation of Eco RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* 96: 171-184.
- Dumble, L.J & MacKay, I.R. (1977) HLA and chronic active hepatitis (CAH). *Digestion* 15: 254-259.
- Edman, J.C., Gray, P., Valenzuela, P., Rall, L.B. & Rutter, W.J. (1980) Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature* 286: 535-538.
- Eisenburg, J. (1982) Die Virus-induzierten Lebererkrankungen des Menschen 1. Die Hepatitis-Viren. *Naturwissenschaften* 69(12): 585-593.
- Eisenburg, J. (1983) Die Virus-induzierten Lebererkrankungen des Menschen. 2. Infektiöse Gelbsucht - Virushepatitis. *Naturwissenschaften* 70(1): 23-32.
- Eisenburg, J. (1983) Die Virus-induzierten Lebererkrankungen des Menschen. 3. Chronische Hepatitis. *Naturwissenschaften* 70(2): 79-85.

- Ellis, R.W., DeFeo, D., Maryak, J.M., Young, H.A., Shih, T.Y., Chang, E.H., Lowy, D.R. & Scolnick, E.M. (1980) Dual evolution origin for the rat genetic sequences of Harvey murine sarcoma virus. *J. Virol.* 36: 408-420.
- Ellis, R.W., DeFeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowy, D.R. & Scolnick, E.M. (1981) The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292: 506-511.
- Enquist, L. & Sternberg, N. (1979) In vitro packaging of lambda Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. *Meth. Enzymol.* 68: 281-298.
- Feitelson, M.A., Marion, P.L. & Robinson, W.S. (1983) The nature of polypeptides larger in size than the major surface antigen components of hepatitis B and like viruses in ground-squirrels, woodchucks and ducks. *Virol.* 130(1): 76-90.
- Fowler, M.J.F., Monjardino, J., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J. & Thomas, H.C. (1984) The mechanism of replication of hepatitis B virus. Evidence of asymmetric replication of the two DNA strands. *J. Med. Virol.* 13: 83-91.
- Freytag von Loringhoven, A. (1984) Struktur und Funktion chromosomal integrierter Hepatitis B Virus DNA aus humanen Hepatomzellen. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Fujiyama, A., Miyanohara, A., Nozaki, C., Yoneyama, T., Ohtomo, N. & Matsubara, K. (1983) Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucl. Acids Res.* 11(13): 4601-4610.
- Gahlmann, R., Leisten, R., Vardimon, L. & Doerfler, W. (1982) Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. *EMBO J.* 1(9): 1101-1104.

- Galibert, F., Mandart, E., Fittousi, F., Tiollais, P. & Charnay, P. (1979) Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281: 646-650.
- Garoff, H. & Ansorge, W. (1981) Improvements of DNA sequencing gels. *Anal. Biochem.* 115: 450-457.
- Gelmann, E.P., Petri, E., Cetta, A. & Wong-Staal, F. (1982) Deletions of specific regions of the simian sarcoma-associated virus genome are found in defective viruses and in the simian sarcoma virus. *J. Virol.* 41: 593-604.
- Gerin, J.L. & Shih, J.W.-K. (1978) Structure of HBsAg and HBcAg. In: Vyas, G.N., Cohen, S.W. & Schmid, R. (Hrsg.), *Viral Hepatitis*, Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 147-158.
- Gerlich, W.H. & Robinson, W.S. (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21: 801-809.
- Gerlich, W.H., Goldmann, U., Müller, R., Stibbe, W. & Wolff, W. (1982) Specificity and localization of the hepatitis B virus associated protein kinase. *J. Virol.* 42: 761-766.
- Goubin, G., Goldman, D.S., Luce, J., Neiman, P.E. & Cooper, G. (1983) Molecular cloning and nucleotide sequence of a transforming gene detected by transfection of chicken B-cell lymphoma DNA. *Nature* 302: 114-119.
- Gough, N. (1983) Core and e antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J. Mol. Biol.* 165: 683-699.
- Graham, F.L. & van der Eb, A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology*

52: 456-467.

Gray, P., Edman, J.C., Valenzuela, P. & Rutter, W.J. (1980)
A human hepatoma cell line contains hepatitis B DNA and
RNA sequences. In: Fields, B.N., Jaenisch, R. & Fox, C.F.
(Hrsg.), Animal Virus Genetics, Academic Press, New York,
pp. 281-294.

Gutai, M.W. & Nathans, D. (1978) Evolutionary variants of
simian virus 40: cellular DNA sequences and sequences at
recombinant joints of substituted variants. J. Mol. Biol.
126: 275-288.

Hen, R., Borelli, E., Sassone-Corsi, P. & Chambon, P. (1983)
An enhancer element is located 340 base pairs upstream
from the adenovirus-2 ElA cap site. Nucl. Acids Res. 11:
8747-8760.

Hess, G., Arnold, W. & Meyer zum Büschenfelde, K.-H. (1981)
Hepatitis B virus associated deoxyribonucleic acid
polymerase. A partial characterization by the use of
chemical agents. Klin. Wschr. 59(12): 691-697.

Hiscott, J.B., Murphy, D. & Defendi, V. (1981) Instability
of integrated viral DNA in mouse cells transformed by
simian virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (3):
1736-1740.

Hofschneider, P.H., Marquardt, O., Wong, T.-K. & Zaslavsky,
V. (1980) Structures specific for hepatitis B virus in
cytoplasmic extracts of a hepatoma cell line producing
hepatitis B surface antigen. In: Essex, M., Todaro, G. &
zur Hausen, H. (Hrsg.), Viruses in Naturally Occurring
Cancers, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring
Harbor, pp. 435-446.

Hohn, B. (1979) In vitro packaging of lambda and cosmid DNA.
Meth. Enzymol. 68: 299-309.

- Hughes, S.H., Mutschler, A., Bishop, J.M. & Varmus, H.E. (1981) A rous sarcoma virus provirus is flanked by short direct repeats of a cellular DNA sequence present in only one copy prior to integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4299-4303.
- Khoury, G. & Gruss, P. (1983) Enhancer elements. *Cell* 33: 313-314.
- Kit, S., Dubbs, D., Piekarski, L. & Hsu, T. (1963) Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine. *Exp. Cell. Res.* 11: 297-312.
- Kitamura, N., Kitamura, A., Toyoshima, K., Hirayama, Y. & Yshida, M. (1982) Avian sarcoma virus Y73 genome sequence and structural similarity of its transforming gene product to that of Rous sarcoma virus. *Nature* 297: 205-208.
- Klein, G. (1981) The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogens. *Nature* 294: 313-318.
- Klein, G. (1983) Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell-derived tumors in mice and men. *Cell* 32: 311-315.
- Knowles, B.B., Howe, C.C. & Aden, P.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209: 497-499.
- Koike, K., Kobayashi, M., Mizusawa, H., Yoshida, E., Yaginuma, K. & Taira, M. (1983) Rearrangement of the surface antigen gene of hepatitis B virus integrated in the human hepatoma cell lines. *Nucl. Acids Res.* 11: 5391-5402.

- Koshy, R., Maupas, P., Müller, R. & Hofschneider, P.H. (1981) Detection of hepatitis B virus specific DNA in the genomes of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues. *J. Gen. Virol.* 57: 95-102.
- Levy, G.A. & Chisari, F.V. (1981) A proposed role for the immune system in the pathogenesis of hepatitis B virus induced liver disease. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 15: 335-353.
- Malpierce, Y., Michel, M.L., Carloni, G., Revel, M., Tiollais, P. & Weissenbach, J. (1983) The gene's promotor of hepatitis B virus confers constitutive gene expression. *Nucl. Acids Res.* 11(13): 4645-4654.
- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G.K. & Efstratiadis, A. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15: 687-701.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Marion, P.L., Salazar, F.H., Alexander, J.J. & Robinson, W.S. (1979) Polypeptides of hepatitis B virus surface antigen produced by a hepatoma cell line. *J. Virol.* 32: 796-802.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. & Robinson, W.S. (1980) A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2941-2945.
- Marquardt, O., Zaslavsky, V. & Hofschneider, P.H. (1982) Evidence for non-chromosomal hepatitis B virus surface (HBsAg) specific DNA sequences in a hepatoma cell line. *J. Gen. Virol.* 61: 105-109.

- Marquardt, O., Freytag von Loringhoven, A. & Frösner, G.G. (1984 a) Expression of hepatitis B virus core antigen gene is induced in human hepatoma cells by their growth in nude mice. *J. Gen. Virol.* 65: 1443-1448.
- Marquardt, O., Freytag von Loringhoven, A., Koshy, R., Hofschneider, P.H., Miller, K. & Desmyter, J. (1984 b) A virus antigen (HBsAg) indicates metastases of human carcinoma cells in the nude mouse. *Med. Microbiol. Immunol.* 172: 233-241.
- Mason, W.S., Seal, G. & Summers, J. (1980) Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human HBV. *J. Virol.* 36: 829-836.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65: 499-560.
- McCollum, R.W. & Zuckerman, A.J. (1981) Viral hepatitis. Report on a WHO informal consultation. *J. Med. Virol.* 8: 1-29.
- McCoy, M.S., Toole, J.J., Cunningham, J.M., Chang, E.H., Lowy, D.R. & Weinberg, R.A. (1983) Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature* 302: 79-81.
- Molnar-Kimber, K.L., Summers, J., Taylor, J.M. & Mason, W.S. (1983) Protein covalently bound to minus strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 45: 165-172.
- Monjardino, J., Fowler, M.J.F., Montano, L., Weller, I., Tsiquaye, K.N., Zuckerman, A.J., Jones, D.M. & Thomas, H.C. (1982) Analysis of hepatitis virus DNA in the liver and serum of HBe antigen positive chimpanzee carriers. *J. Med. Virol.* 9 (3): 189-199.

- Morton, H.J. (1970) A survey of commercially available tissue culture media. *In Vitro* 6: 89-108.
- Mougneau, E., Birg, F., Rassoulzadegan, M. & Cuzin, F. (1980) Integration sites and sequence arrangement of SV40 DNA in a homogenous series of transformed rat fibroblast lines. *Cell* 22: 917-927.
- Murray, N.E., Brammer, W.J. & Murray, K. (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol. gen. Genet.* 150: 53-61.
- Ogston, C.W., Jonak, G.J., Rogler, C.E., Astrin, S.M. & Summers, J. (1982) Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinoma of woodchucks. *Cell* 29: 385-394.
- Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Sugino, Y. & Nishioka, K. (1983) The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucl. Acids Res.* 11(6): 1747-1757.
- Overbeek, P.A., Merlind, G.T., Peters, N.K., Cohn, V.H., Moore, G.P. & Kleinsmith, L.J. (1981) Characterization of five members of the actin gene family in the sea urchin. *Biochim. Biophys. Acta* 656: 195-205.
- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G. & Murray, K. (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282: 575-579.
- Peers, F.G. & Linsell, C.A. (1975) Dietary afltoxins and liver cancer. A population based study in Kenya. *Brit. J. Cancer* 27: 473-485.

- Perbal, B. & Baluda, M.A. (1982) Avian myeloblastosis virus transforming gene is related to unique chicken DNA regions separated by at least one intervening sequence. *J. Virol.* 41: 250-257.
- Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., Lama, C., Fogl, J. & Wigler, M. (1981) Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27: 467-476.
- Pirovino, M., Heer, M., Altorfer, J., Akovbiantz, A., Grob, P. & Schmid, M. (1983) Hepatitis-B-Virusinfektion und hepatozelluläres Karzinom: Hinweise auf einen möglichen Kausalzusammenhang auch im Nichtendemiegebiet Schweiz?. *Schweiz. Med. Wschr.* 113: 824-826.
- Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.-F. & Tiollais, P. (1982) Transcription of the hepatitis B surface antigen gene in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J. Virol.* 42: 100-105.
- Rall, L.B., Standring, D.N., Laub, O. & Rutter, W.J. (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1766-1773.
- Rigby, P.W.J., Dieckman, M., Rhodes, C. & Berg, P. (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- Rizetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W.-K., Pourcell, R.H. & Gerin, J.L. (1980) Delta agent: Association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6124-6128.
- Robinson, W.S. (1977) The genome of hepatitis B virus. *Am. Rev. Microbiol.* 31: 357-377.

- Ruiz-Opazo, N., Chakraborty, P.R. & Shafritz, D.A. (1982) Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: Possible implications in persistent HBV infection. *Cell* 29: 129-138.
- Sattler, F.R., Paolucci, S., Kreidler, J.W. & Ladda, R.L. (1982) A human hepatoma cell line (PLC/PRF/5) produces lung metastases and secretes HBsAg in nude mice. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18: 381-389.
- Shaul, Y., Ziemer, M., Garcia, P.D., Crawford, R., Hsu, H., Valenzuela, P. & Rutter, W.J. (1984) Cloning and analysis of integrated hepatitis virus sequences from a human hepatoma cell line. *J. Virol.* 51: 776-787.
- Sherr, C.J., Fedele, L.A., Oskarsson, M., Maizel, J. & vande Woude, G. (1980) Molecular cloning of Snyder-Theilen feline leukemia and sarcoma viruses: Comparative studies of feline sarcoma virus with its natural helper virus and with Moloney murine sarcoma virus. *J. Virol.* 34: 200-212.
- Simonsen, C.C. & Levinson, A.D. (1983) Analysis of processing and polyadenylation signals of the hepatitis B virus surface antigen gene by using simian virus 40 hepatitis B virus chimeric plasmids. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2250-2258.
- Soberon, X., Covarrubias, L. & Bolivar, F. (1980) Construction and characterization of new cloning vehicles. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. *Gene* 9: 287-305.
- Sobeslavsky, O. (1978) HBV as a global problem. In: Vyas, G.N., Cohen, S.N. & Schmid, R. (Hrsg.), *Viral Hepatitis*, The Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 347-356.

- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Standring, D.N., Rall, L.B., Laub, O. & Rutter, W.J. (1983) Hepatitis B virus encodes an RNA polymerase III transcript. *Mol. cell. Biol.* 3: 1774-1782.
- Stibbe, W. & Gerlich, W.H. (1983) Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. *J. Virol.* 46: 626-628.
- Stringer, J.R. (1981) Integrated simian virus 40 DNA: nucleotide sequences at cell-virus recombinant junctions. *J. Virol.* 38(2): 671-679.
- Summers, J., Smolec, J.M. & Snyder, R. (1978) A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4533-4537.
- Summers, J. & Mason, W.S. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 29: 403-415.
- Szmunness, W., Harley, E.J., Ikram, H. & Stevens, C.E. (1978) Sociodemographic aspects of the epidemiology of hepatitis B. In: Vyas, G.N., Cohen, S.N. & Schmid, R. (Hrsg.), *Viral Hepatitis*, The Franklin Institute Press, Philadelphia, pp. 297-320.
- Tavassolie, H. & Kawanishi, H. (1978) Serum factors inhibition of lymphocyte proliferation and suppressor T cell function in alcoholic and chronic active liver disease. *Gastroenterology* 75: 990-990.

- Thomas, H.C., Montano, L., Goodall, A., DeKoning, R., Oladapo, J. & Wiedman, K.H. (1982) Immunological mechanisms in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2: 116S-121S.
- Tiollais, P., Charnay, P. & Vyas, G.N. (1981) Biology of hepatitis B virus. *Science* 213: 406-411.
- Tooze, J. (Hrsg.) (1980) DNA Tumor Viruses, Molecular Biology of Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Gray, P. & Rutter, W.J. (1980) The nucleotide sequence of hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes. In: Fields, B.N., Jaenisch, R. & Fox, C.F. (Hrsg.), *Animal Virus Genetics*, Academic Press, New York, pp. 57-70.
- Vennström, B., Fanshier, L., Moscovici, C. & Bishop, J.M. (1980) Molecular cloning of the avian erythroblastosis virus genome and recovery of oncogenic virus by transfection of chicken cells. *J. Virol.* 36: 575-585.
- Vyas, G.N., Peterson, D.L., Townsend, R.M., Dahmle, S.R. & Magnus, L.O. (1977) Hepatitis B "e" antigen: An apparent association with lactate dehydrogenase isozyme-5. *Science* 198: 1068-1070.
- Wang, J.Y.J. & Baltimore, D. (1983) Cellular RNA homologous to the Abelson murine leukemia virus transforming gene: Expression and relationship to the viral sequence. *Mol. Cell. Biol.* 3: 773-779.
- Weiss, R. (1984) Tissue-specific transformation by human T-cell leukaemia virus. *Nature* 310: 273-274.

Will, H., Cattaneo, R., Koch, H.G., Darai, C., Schaller, H., Schellekens, H., van Eerd, P.M.C.A. & Deinhardt, F. (1982) Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 299: 740-742.

Yoakum, G.H., Korba, B.E., Lechner, J.F., Tokiwa, T., Gozdar, A.F., Seeley, T., Siegel, M., Leeman, L., Autrup, H. & Harris, C.C. (1983) High-frequency transfection and cytopathology of the hepatitis B virus core antigen gene in human cells. *Science* 222: 385-389.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried bei München) in der Abteilung Virusforschung unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider danke ich für sein großes Interesse an dieser Arbeit und für die damit verbundene Förderung.

Herrn Professor Dr. Horst Schmieger danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Rajen Koshy für seine wertvollen Ratschläge und die stete Diskussionsbereitschaft. Für die vielen, nützlichen Gespräche möchte ich mich bei Herrn Dr. Arndt Freytag von Loringhoven bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Regine Kahmann für ihre Hilfe beim Erlernen der DNA-Sequenzierungstechnik.

Für technische Hilfe danke ich Frau Irene Dick und Frä. Sabine Hankel (Gewebekultur) und Frau Ester Piravandi-Weber (Plasmidisolierungen).

LEBENS LAUF

- 27.5.1954 geboren in München
- 1960 - 64 Grundschule in München
- 1964 - 73 Oskar-von-Miller-Gymnasium in München,
Reifeprüfung
- 1973 - 74 Grundwehrdienst
- 1974 - 75 Studium der Biologie an der
Ruhr-Universität in Bochum
- ab 1975 Weiterführung des Biologiestudiums an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1977 Diplom-Vorprüfung
- ab 1978 verheiratet mit Edith Koch
- 1980 Diplom-Hauptprüfung
- Nov. 1980 - Juli 1981 Diplomarbeit: "Charakterisierung
und Kartierung zweier Mutanten von Salmonella
typhimurium mit temperatur-sensiblen DNS-
Stoffwechsel" unter Anleitung von
Prof. Dr. H. Schmieger (Institut für Genetik
und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Uni-
versität, München)
- Sept. 1981 - Dez. 1984 Dissertationsarbeit unter Anleitung
von Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider (Abteilung
Virusforschung, Max-Planck-Institut für
Biochemie, Martinsried)

